

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|   |    |   |
|---|----|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation 7 :<br>C07H 21/00, C12Q 1/68 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/31101<br>(43) Internationales<br>Veröffentlichungsdatum: 2. Juni 2000 (02.06.00) |
|---|----|---|

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/08888  
(22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1999 (19.11.99)  
(30) Prioritätsdaten:  
198 53 957.6 23. November 1998 (23.11.98) DE  
199 21 940.0 29. April 1999 (29.04.99) DE  
(71)(72) Anmelder und Erfinder: HARTWICH, Gerhard [DE/DE];  
Nibelungenstrasse 10, D-80639 München (DE).  
(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HELLER, Adam [US/US];  
7531 Velburn Circle, Austin, TX 78731 (US).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht  
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: METHOD FOR THE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF NUCLEIC ACID OLIGOMER HYBRIDS

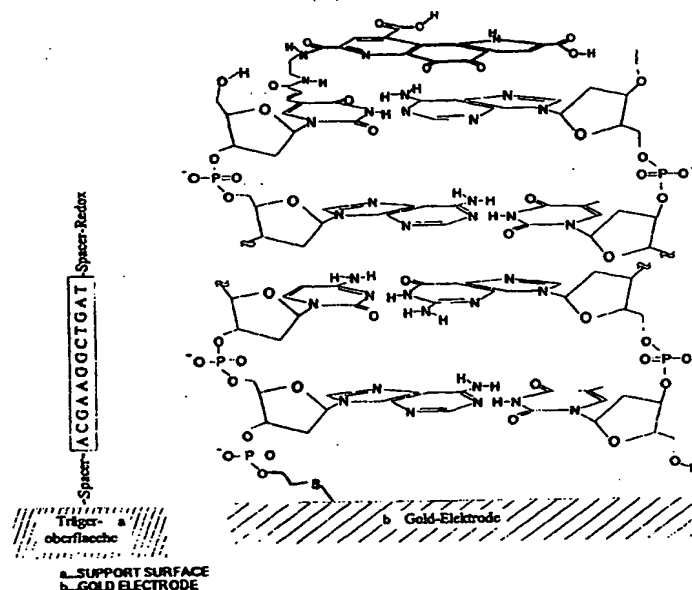
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ELEKTROCHEMISCHEN DETEKTION VON NUKLEINSÄUREOLIGOMERHYBRIDEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for the electrochemical detection of sequence-specific nucleic acid oligomer hybridization events. To this end single DNA/RNA/PNA oligomer strands which at one end are covalently joined to a support surface and at the other, free end, covalently linked to a redox pair, are used as hybridization matrix (probe). As a result of treatment with the oligonucleotide solution (target) to be examined, the electric communication between the conductive support surface and the redox pair bridged by the single-strand oligonucleotide, which communication initially is either absent or very weak, is modified. In case of hybridization, electric communication between the surface support and the redox pair, which is now bridged by a hybridized double-strand oligonucleotide, is increased. This permits the detection of a hybridization event by electrochemical methods such as cyclic voltametry, amperometry or conductivity measurement.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von sequenzspezifischen Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen. Dabei dienen DNA-/RNA-/PNA-Oligomer-Einzelstränge, die mit einem Ende kovalent auf einer Trägeroberfläche angebunden und am anderen, freien Ende kovalent mit einem Redoxpaar verknüpft sind, als Hybridisierungsmatrix ("Sonde"). Durch Behandlung mit der zu untersuchenden Oligonukleotid-Lösung ("Target") wird die ursprünglich nicht oder nur schwach vorhandene elektrische Kommunikation zwischen der leitfähigen Trägeroberfläche und dem über Einzelstrang-Oligonukleotid verbrückten Redoxpaar verändert. Im Falle der Hybridisierung wird die elektrische Kommunikation zwischen der Trägeroberfläche und dem nunmehr über hybridisiertes Doppelstrang-Oligonukleotid verbrückten Redoxpaar verstärkt. Somit wird die Detektion eines Hybridisierungsereignisses durch elektrochemische Verfahren wie cyclische Voltametrie, Amperometrie oder Leitfähigkeitsmessung ermöglicht.



### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                      |    |  |    |                                   |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                              | LS | Lesotho  | SI | Slowenien                         |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                             | LT | Litauen  | SK | Slowakei                          |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                           | LU | Luxemburg  | SN | Senegal                           |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                                | LV | Lettland   | SZ | Swasiland                         |
| AZ | Aserbaidshan                 | GB | Vereinigtes Königreich               | MC | Monaco   | TD | Tschad                            |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                             | MD | Republik Moldau                                    | TG | Togo                              |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                                | MG | Madagaskar   | TJ | Tadschikistan                     |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                               | MK | Die ehemalige jugoslawische<br>Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                      |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                         | ML | Mali   | TR | Türkei                            |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                               | MN | Mongolei   | TT | Trinidad und Tobago               |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                               | MR | Mauretanien  | UA | Ukraine                           |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                               | MW | Malawi   | UG | Uganda                            |
| BY | Belarus                      | IS | Island                               | MX | Mexiko   | US | Vereinigte Staaten von<br>Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                              | NE | Niger  | UZ | Usbekistan                        |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                                | NL | Niederlande  | VN | Vietnam                           |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                                | NO | Norwegen   | YU | Jugoslawien                       |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                          | NZ | Neuseeland   | ZW | Zimbabwe                          |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik<br>Korea | PL | Polen  |    |                                   |
| CM | Kamerun                      | KR | Republik Korea                       | PT | Portugal   |    |                                   |
| CN | China                        | KZ | Kasachstan                           | RO | Rumänien   |    |                                   |
| CU | Kuba                         | LC | St. Lucia                            | RU | Russische Föderation                               |    |                                   |
| CZ | Tschechische Republik        | LI | Liechtenstein                        | SD | Sudan  |    |                                   |
| DE | Deutschland                  | LK | Sri Lanka                            | SE | Schweden   |    |                                   |
| DK | Dänemark                     | LR | Liberia                              | SG | Singapur   |    |                                   |
| EE | Estland                      |    |                                      |    |  |    |                                   |

# Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäureoligomerhybriden

## Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft ein modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer, sowie ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von sequenzspezifischen Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen:

## Stand der Technik

Zur Sequenzanalyse von DNA und RNA, z. B. in der Krankheitsdiagnose, bei toxikologischen Testverfahren, in der genetischen Forschung und Entwicklung, sowie auf dem Agrar- und pharmazeutischen Sektor, werden im allgemeinen gel-elektrophoretische Verfahren mit autoradiographischer oder optischer Detektion verwendet.

Zur Veranschaulichung des wichtigsten gel-elektrophoretischen Verfahrens mit optischer Detektion (Sanger-Verfahren) ist in Figur 1b ein DNA-Fragment mit Primer dargestellt. Bei dem Sanger-Verfahren wird eine DNA enthaltende Lösung in vier Ansätze aufgeteilt und der Primer jedes Ansatzes mit je einem bei verschiedener Wellenlänge emitierenden Fluoreszenzfarbstoff kovalent modifiziert. Wie in Figur 1b dargestellt wird zu jedem Ansatz Desoxyribonucleosid-Triphosphat der Basen A (Adenin), T (Thymin), C (Cytosin), und G (Guanin), also dATP, dTTP, dCTP und dGTP, gegeben, um den Einzelstrang, ausgehend vom Primer, durch DNA-Polymerase I enzymatisch zu replizieren. Zusätzlich zu den vier Desoxyribonucleosid-Triphosphaten enthält jedes Reaktionsgemisch noch genügend des 2',3'-Didesoxyanalogons (Figur 1a) eines dieser Nukleosidtriphosphate als Stopbase (je eine der 4 möglichen Stoppbasen pro Ansatz), um die Replikation an allen möglichen Bindungsstellen zu stoppen. Nach Vereinigung der vier Ansätze entstehen replizierte DNA-Fragment aller Längen mit stopbasenspezifischer Fluoreszenz, die gel-elektrophoretisch der Länge nach sortiert und durch Fluoreszenz-Spektroskopie charakterisiert werden können (Figur 1c).

Ein anderes optisches Detektionsverfahren basiert auf der Anlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen wie z. B. Ethidiumbromid an Oligonukleotide. Die Fluoreszenz solcher Farbstoffe steigt im Vergleich zur freien Lösung des Farbstoffs um etwa das 20-fache an, wenn sie sich an doppelsträngige DNA oder RNA

anlagern und kann deshalb zum Nachweis hybridisierter DNA oder RNA verwendet werden.

Bei der radioaktiven Markierung wird  $^{32}\text{P}$  in das Phosphatgerüst der Oligonukleotide eingebaut, wobei  $^{32}\text{P}$  gewöhnlich am 5'-Hydroxylende durch Polynukleotid-Kinase addiert wird. Die markierte DNA wird anschließend an jeweils einem der vier Nukleotidtypen bevorzugt gespalten und zwar unter definierten Bedingungen, so daß pro Kette durchschnittlich eine Spaltung erfolgt. Damit liegen im Reaktionsgemisch für einen bestimmten Basentyp Ketten vor, die sich von der  $^{32}\text{P}$ -Markierung bis zur Position dieser Base erstrecken (bei mehrfachem Auftreten der Base erhält man entsprechend Ketten unterschiedlicher Länge). Die vier Fragmentgemische werden anschließend auf vier Bahnen gel-elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wird vom Gel ein Autoradiogramm angefertigt, an dem die Sequenz unmittelbar abgelesen werden kann.

Vor einigen Jahren wurde ein weiteres, auf optischer (oder autoradiographischer) Detektion beruhendes Verfahren zur DNA-Sequenzierung entwickelt, nämlich die Sequenzierung durch Oligomerhybridisierung (vgl. z. B. Drmanac et al., Genomics 4, (1989), S. 114-128 oder Bains et al., Theor. Biol. 135, (1988), S. 303-307). Bei diesem Verfahren wird ein vollständiger Satz kurzer Oligonukleotide bzw. Oligomere (Sonden-Oligonukleotide), z. B. alle 65 536 möglichen Kombinationen der Basen A, T, C und G eines Oligonukleotid-Oktamers auf ein Trägermaterial gebunden. Die Anbindung geschieht in einem geordneten Raster aus 65 536 Test-Sites, wobei jeweils eine größere Menge einer Oligonukleotid-Kombination ein Test-Site definieren und die Position jeder einzelnen Test-Site (Oligonukleotid-Kombination) bekannt ist. Auf solch einer Hybridisierungsmatrix, dem Oligomerchip, wird ein DNA-Fragment, dessen Sequenz man ermitteln will, das Target, mit Fluoreszenz-Farbstoff (oder  $^{32}\text{P}$ ) markiert und unter Bedingungen, die nur eine spezifische Doppelstrangbildung erlauben, hybridisiert. Dadurch bindet das Target DNA-Fragment nur an die Oligomere (im Beispiel an die Oktamere), deren komplementäre Sequenz exakt einem Teil (einem Oktamer) seiner eigenen Sequenz entspricht. Durch optische (oder autoradiographische) Detektion der Bindungsposition des hybridisierten DNA-Fragments werden damit alle im Fragment vorhandenen Oligomersequenzen (Oktamersequenzen) bestimmt. Aufgrund der Überlappung benachbarter Oligomersequenzen kann durch geeignete mathematische Algorithmen die fortlaufende Sequenz des DNA-Fragments bestimmt werden. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen unter anderem in der Miniaturisierung der Sequenzierung und damit in der enormen Datenmenge, die gleichzeitig in einem Arbeitsgang erfaßt wird. Daneben kann auf Primer und auf das gel-

elektrophoretische Auftrennen der DNA-Fragmente verzichtet werden. Beispielhaft ist dieses Prinzip in Figur 2 für ein 13 Basen langes DNA-Fragment gezeigt.

Die Verwendung radioaktiver Markierungen bei der DNA-/RNA- Sequenzierung ist mit mehreren Nachteilen verbunden, wie z. B. aufwendige, gesetzlich vorgeschriebene Sicherheitsvorkehrungen beim Umgang mit radioaktiven Materialien, die Strahlenbelastung, das begrenzte räumliche Auflösungsvermögen (maximal  $1\text{mm}^2$ ) und eine Sensitivität, die nur dann hoch ist, wenn die Strahlung der radioaktiven Fragmente entsprechend lange (Stunden bis Tage) auf einen Röntgenfilm einwirkt. Es kann zwar die räumliche Auflösung durch zusätzliche Hard- und Software erhöht und die Detektionszeit durch die Verwendung von  $\beta$ -Scannern verkürzt werden, beides ist jedoch mit erheblichen zusätzlichen Kosten verbunden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe, die üblicherweise zur Markierung der DNA verwendet werden, sind zum Teil (z. B. Ethidiumbromid) mutagen und erfordern, ebenso wie die Anwendung der Autoradiographie, entsprechende Sicherheitsvorkehrungen. In fast allen Fällen erfordert die Verwendung optischer Detektion den Gebrauch von einem oder mehreren Lasersystemen und somit geschultes Personal und entsprechende Sicherheitsvorkehrungen. Die eigentliche Detektion der Fluoreszenz erfordert zusätzliche Hardware, wie z. B. optische Bauelemente zur Verstärkung und, bei verschiedenen Anregungs- und Abfragewellenlängen wie im Sanger-Verfahren, ein Kontrollsystem. Abhängig von den benötigten Anregungswellenlängen und der gewünschten Detektionsleistung können somit erhebliche Investitionskosten entstehen. Bei der Sequenzierung durch Hybridisierung auf dem Oligomercip ist die Detektion noch (kosten)aufwendiger, da, neben dem Anregungssystem, zur 2-dimensionalen Detektion der Fluoreszenzspots hochauflösende CCD-Kameras (Charge Coupled Device Kameras) benötigt werden.

Obwohl es also quantitative und extrem sensitive Methoden zur DNA-/RNA-Sequenzierung gibt, sind diese Methoden zeitaufwendig, bedingen aufwendige Probenpräparation und teure Ausstattung und sind im allgemeinen nicht als transportable Systeme verfügbar.

### **Darstellung der Erfindung**

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomerhybriden zu schaffen, welche die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweisen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das modifizierte Oligonukleotid gemäß unabhängigem Patentanspruch 1, durch das Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Oligonukleotids gemäß unabhängigem Anspruch 9 und 10, durch die modifizierte leitfähige Oberfläche gemäß unabhängigem Patentanspruch 11, das Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche gemäß unabhängigem Patentanspruch 21, sowie durch das Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Oligomerhybridisierungsereignissen gemäß unabhängigem Patentanspruch 27 gelöst.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

### Genetik

|              |  |
|--------------|--|
| DNA          | Desoxyribonukleinsäure   |
| RNA          | Ribonukleinsäure   |
| PNA          | Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA, bei der die Zucker-Phosphat Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat Einheit durch die $-NH-(CH_2)_2-N(COCH_2\text{-Base})-CH_2CO\text{-}$ Einheit hybridisiert PNA mit DNA).  |
| A            | Adenin   |
| G            | Guanin   |
| C            | Cytosin  |
| T            | Thymin   |
| Base         | A, G, T, oder C  |
| Bp           | Basenpaar  |
| Nukleinsäure | wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z. B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer |

|                       |  |
|-----------------------|--|
|                       | <p>Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist, daß sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann.</p>  |
| Nukleinsäure-Oligomer | <p>Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z. B. Nukleinsäure-Oktamer: eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei dem 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).</p>  |
| Oligomer              | <p>Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.</p>  |
| Oligonukleotid        | <p>Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z. B. ein DNA, PNA oder RNA Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.</p>   |
| Oligo                 | <p>Abkürzung für Oligonukleotid.</p>   |
| dATP                  | <p>Desoxyribonucleosid-Triphosphat des A (DNA-Einheit mit der Base A und zwei weiteren Phosphaten zum Aufbau eines längeren DNA-Fragments bzw. eines Oligonukleotids).</p>   |
| dGTP                  | <p>Desoxyribonucleosid-Triphosphat des G (DNA-Einheit mit der Base G und zwei weiteren Phosphaten zum Aufbau eines längeren DNA-Fragments bzw. eines Oligonukleotids).</p>   |
| dCTP                  | <p>Desoxyribonucleosid-Triphosphat des C (DNA-Einheit mit der Base C und zwei weiteren Phosphaten zum Aufbau eines längeren DNA-Fragments bzw. eines Oligonukleotids).</p>   |
| dTTP                  | <p>Desoxyribonucleosid-Triphosphat des T (DNA-Einheit mit der Base T und zwei weiteren Phosphaten zum Aufbau eines längeren DNA-Fragments bzw. eines Oligonukleotids).</p>   |
| Primer                | <p>Start-Komplementär-Fragment eines Oligonukleotids, wobei die Basenlänge des Primers nur ca. 4-8 Basen beträgt. Dient als Ansatzpunkt für die enzymatische Replikation des Oligonukleotids.</p>  |
| Mismatch              | <p>Zur Ausbildung der Watson Crick Struktur doppelsträngiger Oligonukleotide hybridisieren die beiden Einzelstränge derart, daß die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt). Jede andere Basenpaarung bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als „Mismatch“ bezeichnet.</p> |

|    |                              |
|----|------------------------------|
| ds | double strand (Doppelstrang) |
| ss | single strand (Einzelstrang) |

### **Chemische Substanzen/Gruppen**

|                |   |
|----------------|---|
| R              | beliebiger, nicht näher spezifizierter organischer Rest als Substituent oder Seitenkette.   |
| Redox          | redoxaktive Substanz  |
| Alkyl          | Der Begriff "Alkyl" bezeichnet ein gesättigtes Kohlenwasserstoffradikal, das geradkettig oder verzweigt ist (z.B. Ethyl, Isopropyl oder 2,5-Dimethylhexyl etc.). Wenn "Alkyl" benutzt wird, um auf einen Linker oder Spacer zu verweisen, bezeichnet der Begriff eine Gruppe mit zwei verfügbaren Valenzen für die kovalente Verknüpfung (z. B. $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ oder $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ etc.). Bevorzugte Alkylgruppen als Substituenten oder Seitenketten R sind solche der Kettenlänge 1-30 (längste durchgehende Kette von aneinandergebundenen Atomen). Bevorzugte Alkylgruppen als Linker oder Spacer sind solche der Kettenlänge 1-20, insbesondere der Kettenlänge 1-14, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den Linker oder Spacer verbundenen Strukturen darstellt. |
| Alkenyl        | Alkylgruppen bei denen eine oder mehrere der C-C Einfachbindungen durch C=C Doppelbindungen ersetzt sind.   |
| Alkynyl        | Alkyl- oder Alkenylgruppen bei denen eine oder mehrere der C-C Einfach- oder C=C Doppelbindungen durch C $\equiv$ C Dreifachbindungen ersetzt sind.   |
| Hetero-Alkyl   | Alkylgruppen bei denen eine oder mehrere der C-H Bindungen oder C-C Einfachbindungen durch C-N, C=N, C-P, C=P, C-O, C=O, C-S oder C=S Bindungen ersetzt sind.   |
| Hetero-Alkenyl | Alkenylgruppen bei denen eine oder mehrere C-H Bindungen, C-C Einfach- oder C=C Doppelbindungen durch C-N, C=N, C-P, C=P, C-O, C=O, C-S oder C=S Bindungen ersetzt sind.  |
| Hetero-Alkynyl | Alkynylgruppen bei denen eine oder mehrere der C-H Bindungen, C-C Einfach-, C=C Doppel- oder C $\equiv$ C Dreifachbindung durch C-N, C=N, C-P, C=P, C-O, C=O, C-S oder C=S Bindungen ersetzt sind.  |



## Linker

molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül. In der Regel sind Linker als Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Hetero-Alkyl-, Hetero-Alkenyl- oder Heteroalkynylkette käuflich zu erwerben, wobei die Kette an zwei Stellen mit (gleichen oder verschiedenen) reaktiven Gruppen derivatisiert ist. Diese Gruppen bilden in einfachen/bekannten chemischen Reaktionen mit den entsprechenden Reaktionspartner eine kovalente chemische Bindung aus. Die reaktiven Gruppen können auch photoaktivierbar sein, d. h. die reaktiven Gruppen werden erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge aktiviert. Bevorzugte Linker sind solche der Kettenlänge 1 - 20, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, wobei die Kettenlänge hier die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen, also zwischen den zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, darstellt.

## Spacer

Linker, der über die reaktiven Gruppen an eine oder beide der zu verbindenden Strukturen (siehe Linker) kovalent angebunden ist. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge 1 - 20, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.

(n x HS-Spacer)-  
oligo

Nukleinsäure-Oligomer, an das n Thiofunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei die Spacer jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Thiofunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein und "n" ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.

(n x R-S-S-  
Spacer)-oligo

Nukleinsäure-Oligomer, an das n Disulfidfunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei ein beliebiger Rest R die Disulfidfunktion absättigt. Der Spacer zur Anbindung der

|                               |   |
|-------------------------------|---|
|                               | Disulfidfunktion an das Nukleinsäure-Oligomer kann jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidfunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein. Der Platzhalter "n" ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.   |
| oligo-Spacer-S-S-Spacer-oligo | zwei gleiche oder verschiedene Nukleinsäure-Oligomere, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind, wobei die Disulfidbrücke über zwei beliebige Spacer an die Nukleinsäure-Oligomere angebunden ist und die beiden Spacer eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidbrücke und dem jeweiligen Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14 und diese Spacer wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diese durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein können. |
| PQQ                           | Pyrrolo-Chinolono-Chinon, entspricht: 4,5-Dihydro-4,5-dioxo-1H-pyrrolo-[2,3-f]-chinolin-2,7,9-tricarboxylsäure)   |
| TEATFB                        | Tetraethylammonium-tetrafluoroborat   |
| sulfo-NHS                     | N-Hydroxysulfosuccinimid  |
| EDC                           | (3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid   |
| HEPES                         | N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]   |
| Tris                          | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| EDTA                          | Ethylendiamin-Tetraacetat (Natriumsalz)   |
| Cystamin                      | $(\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-)_2$  |

#### ***modifizierte Oberflächen/Elektroden***

|                   |  |
|-------------------|--|
| Mica              | Muskovit-Plättchen, Trägermaterial zum Aufbringen dünner Schichten.  |
| Au-S-ss-oligo-PQQ | Gold-Film auf Mica mit kovalent aufgebrachter Monolayer aus derivatisiertem 12Bp Einzelstrang Oligonukleotid (Sequenz: |

TAGTCGGAAGCA). Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3' Ende mit  $(\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{S})_2$  zum  $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2-\text{S-S}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$  verestert, wobei die S-S Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Die endständige Base Thymin am 5'- Ende des Oligonukleotids ist am C-5 Kohlenstoff mit  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  modifiziert und dieser Rest wiederum ist über seine freie Aminogruppe durch Amidbildung mit einer Carbonsäuregruppe des PQQ verbunden.

*Au-S-ds-oligo-PQQ* Au-S-ss-oligo-PQQ, welches mit dem zu ss-oligo (Sequenz: TAGTCGGAAGCA) komplementären Oligonukleotid hybridisiert vorliegt.

### Elektrochemie

|                  |   |
|------------------|---|
| $E$              | Elektrodenpotential, das an der Arbeitselektrode anliegt.   |
| $E_0$            | Halbstufenpotential, Potential in der Mitte zwischen den Strom-Maxima für Oxidation und Reduktion einer in der Cyclovoltametrie reversiblen Elektrooxidation oder -reduktion.   |
| $i$              | Stromdichte (Strom pro $\text{cm}^2$ Elektrodenoberfläche)  |
| Cyclovoltametrie | Aufzeichnung einer Strom/Spannungskurve. Hierbei wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode zeitabhängig linear verändert, ausgehend von einem Potential bei dem keine Elektrooxidation oder -reduktion stattfindet bis zu einem Potential bei dem eine gelöste oder an die Elektrode adsorbierte Spezies oxidiert oder reduziert wird (also Strom fließt). Nach Durchlaufen des Oxidations- bzw. Reduktionsvorgangs, der in der Strom/Spannungskurve einen zunächst ansteigenden Strom und nach Erreichen eines Maximums einen allmählich abfallenden Strom erzeugt, wird die Richtung des Potentialvorschubs umgekehrt. Im Rücklauf wird dann das Verhalten der Produkte der Elektrooxidation oder -reduktion aufgezeichnet. |
| Amperometrie     | Aufzeichnung einer Strom/Zeitkurve. Hierbei wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode z. B. durch einen Potentialsprung auf ein Potential gesetzt, bei dem die Elektrooxidation oder -reduktion einer gelösten oder adsorbierten Spezies stattfindet und der fließende Strom wird in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.   |

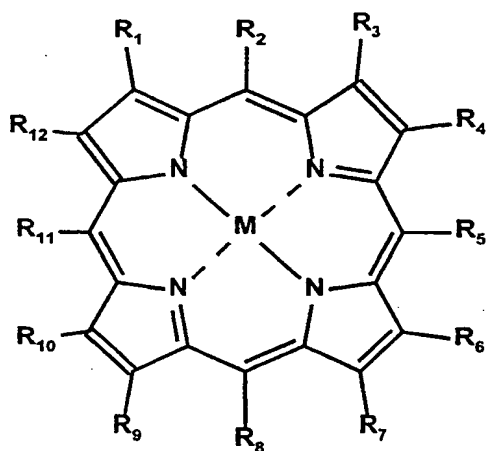
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäure-Oligomer, das durch chemische Anbindung einer redoxaktiven Substanz modifiziert ist. Als Nukleinsäure-Oligomer wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verbindung aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Nukleotiden oder aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin), bevorzugt ein DNA-, RNA- oder PNA-Fragment, verwendet. In der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Begriff Nukleinsäure auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Rückgrat-Strukturen, wie z. B. ein Thio-Phosphat-, ein Dithio-Phosphat- oder ein Phosphoramid-Rückgrat. Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist, daß sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann. Alternativ zu dem Begriff "Nukleinsäure-Oligomer" werden die Begriffe "(Sonden-) Oligonukleotid", "Nukleinsäure" oder "Oligomer" verwendet.

Die redoxaktive Substanz ist bei einem Potential  $\phi$  selektiv oxidierbar und reduzierbar, wobei  $\phi$  der Bedingung  $2,0 \text{ V} \geq \phi \geq -2,0 \text{ V}$  genügt. Das Potential bezieht sich hierbei auf die freie, unmodifizierte, redoxaktive Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel, gemessen gegen Normalwasserstoffelektrode. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist der Potentialbereich  $1,7 \text{ V} \geq \phi \geq -1,7 \text{ V}$  bevorzugt, wobei der Bereich  $1,4 \text{ V} \geq \phi \geq -1,2 \text{ V}$  besonders bevorzugt ist und der Bereich  $0,9 \text{ V} \geq \phi \geq -0,7 \text{ V}$ , in dem die redoxaktive Substanz des Anwendungsbeispiels reduziert und reoxidiert wird, ganz besonders bevorzugt ist. Daneben betrifft die vorliegende Erfindung eine leitfähige Oberfläche, an die direkt oder indirekt (über einen Spacer) ein Nukleinsäure-Oligomer mit angebundener redoxaktiver Substanz chemisch gebunden ist. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche, wobei ein modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer auf eine leitfähige Oberfläche aufgebracht wird. Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, das die elektrochemische Detektion molekularer Strukturen, insbesondere die elektrochemische Detektion von DNA-/RNA-/PNA-Fragmenten in einer Probenlösung durch sequenzspezifische Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierung ermöglicht. Die Detektion der Hybridisierungsereignisse durch elektrische Signale ist eine einfache und kostengünstige Methode und ermöglicht in einer batteriebetriebenen Variante eines Sequenziergeräts den Einsatz vor Ort.

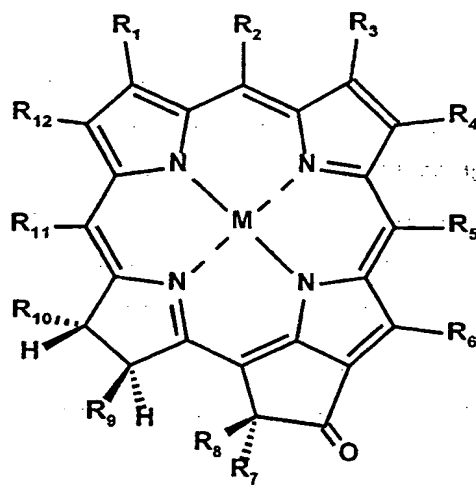
## Bindung einer redoxaktiven Substanz an ein Nukleinsäure-Oligomer

Voraussetzung für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Bindung einer redoxaktiven Substanz an ein Nukleinsäure-Oligomer. Erfindungsgemäß kann dazu jede redoxaktive Substanz verwendet werden, solange sie bei einem Potential  $\varphi$ , das der Bedingung  $2,0 \text{ V} \geq \varphi \geq -2,0 \text{ V}$  genügt, selektiv oxidierbar und reduzierbar ist. Das Potential bezieht sich hierbei auf die freie, unmodifizierte, redoxaktive Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel, gemessen gegen Normalwasserstoffelektrode. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist der Potentialbereich  $1,7 \text{ V} \geq \varphi \geq -1,7 \text{ V}$  bevorzugt, wobei der Bereich  $1,4 \text{ V} \geq \varphi \geq -1,2 \text{ V}$  besonders bevorzugt ist und der Bereich  $0,9 \text{ V} \geq \varphi \geq -0,7 \text{ V}$ , in dem die redoxaktive Substanz des Anwendungsbeispiels reduziert und reoxidiert wird, ganz besonders bevorzugt ist. Unter dem Begriff "selektiv oxidierbar und reduzierbar" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Redoxreaktion, also Abgabe oder Aufnahme eines Elektrons, verstanden, welche selektiv am Ort der redoxaktiven Substanz stattfindet. Durch das angelegte Potential wird also letztendlich kein anderer Teil des Nukleinsäure-Oligomers reduziert oder oxidiert, sondern ausschließlich die an das Nukleinsäure-Oligomer gebundene redoxaktive Substanz.

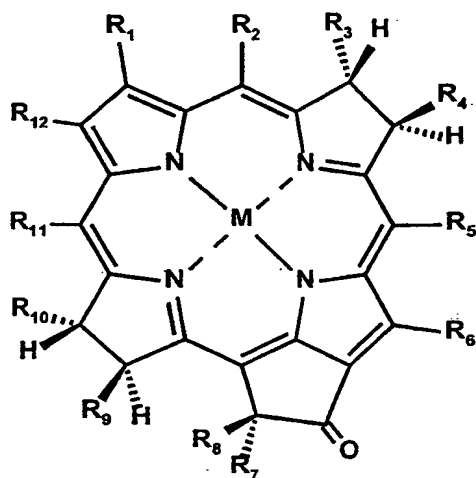
Unter redoxaktiver Substanz wird erfindungsgemäß jedes beliebige Molekül verstanden, daß im elektrochemisch zugänglichen Potentialbereich der jeweiligen Trägeroberfläche (Elektrode) durch Anlegen einer äußeren Spannung an dieser Elektrode elektrooxidiert/-reduziert werden kann. Neben üblichen organischen und anorganischen redoxaktiven Substanzen wie z. B. Hexacyanoferraten, Ferrocenen, Acridinen oder Phtalocyaninen eignen sich zur Anbindung an das Sonden-Oligonukleotid insbesondere redoxaktive Farbstoffe wie z. B. (Metallo-) Porphyrine der allgemeinen Formel 1, (Metallo-) Chlorophylle der allgemeinen Formel 2 oder (Metallo-) Bakteriochlorophylle der allgemeinen Formel 3, (farbige) natürlich vorkommende Oxidations-Agentien wie z. B. Flavine der allgemeinen Formel 4, Pyridin-Nukleotide der allgemeinen Formel 5 oder Pyrrolo-Chinolin-Chinone (PQQ) der allgemeinen Formel 6 oder sonstige Chinone wie z. B. 1,4-Benzochinone der allgemeinen Formel 7, 1,2-Benzochinone der allgemeinen Formel 8, 1,4-Naphtochinone der allgemeinen Formel 9, 1,2-Naphtochinone der allgemeinen Formel 10 oder 9,10-Anthrachinone der allgemeinen Formel 11.



Formel 1

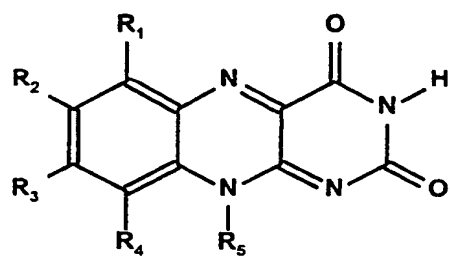


Formel 2

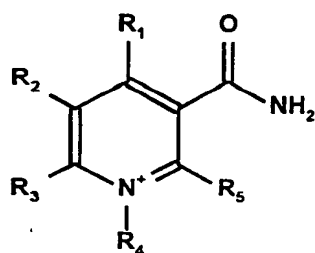


Formel 3

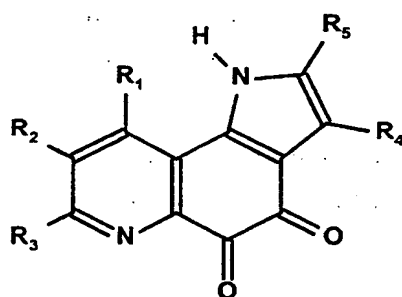
M = 2H, Mg, Zn, Cu, Ni, Pd, Co, Cd, Mn, Fe, Sn, Pt etc.; R<sub>1</sub> bis R<sub>12</sub> sind unabhängig voneinander H oder beliebige Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkinyl-Substituenten.



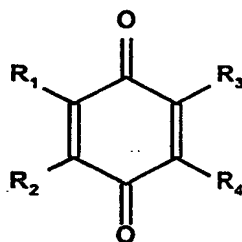
Formel 4



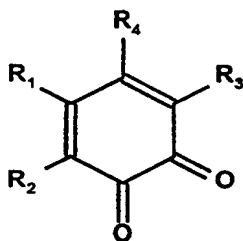
Formel 5



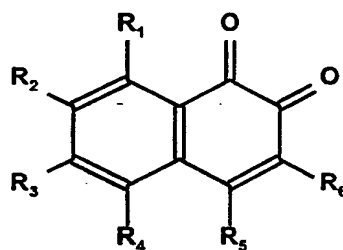
Formel 6



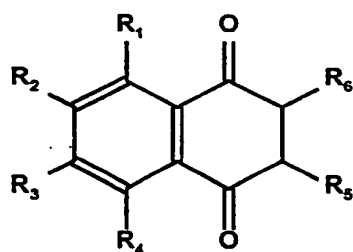
Formel 7



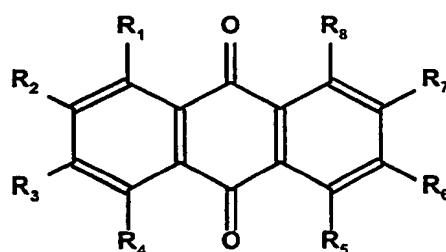
Formel 8



Formel 9



Formel 10



Formel 11

R<sub>1</sub> bis R<sub>8</sub> sind unabhängig voneinander H oder beliebige Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkinyl-Substituenten.

Erfindungsgemäß wird eine redoxaktive Substanz an ein Oligonukleotid kovalent durch die Reaktion des Oligonukleotids mit der redoxaktiven Substanz gebunden. Diese Bindung kann auf drei verschiedene Arten durchgeführt werden:

a) Als reaktive Gruppe zur Bindungsbildung am Nukleinsäure-Oligomer wird eine freie Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe des Oligonukleotid-Rückgrats, insbesondere eine Gruppe an einem der beiden Enden des Oligonukleotid-Rückgrats, verwendet. Die freien, endständigen Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen weisen eine erhöhte Reaktivität auf und gehen daher leicht typische Reaktionen wie z. B. Amidbildung mit (primären oder sekundären) Aminogruppen bzw. mit Säuregruppen, Esterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Alkoholen bzw. mit Säuregruppen, Thioesterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Thio-Alkoholen bzw. mit Säuregruppen oder die Kondensation von Amin und Aldehyd mit anschließender Reduktion der entstandenen  $\text{CH}=\text{N}$  Bindung zur  $\text{CH}_2\text{-NH}$  Bindung ein. Die zur kovalenten Anbindung der redoxaktiven Substanz nötige Kopplungsgruppe (Säure-, Amin-, Alkohol-, Thioalkohol- oder Aldehydfunktion) ist entweder natürlicherweise an der redoxaktiven Substanz vorhanden oder wird durch chemische Modifikation der redoxaktiven Substanz erhalten.

b) Das Nukleinsäure-Oligomer ist über einen kovalent angebundenen Molekülteil (Spacer) beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt), insbesondere der Kettenlänge 1 bis 14, am Oligonukleotid-Rückgrat bzw. an einer Base mit einer reaktiven Gruppe modifiziert. Die Modifikation erfolgt bevorzugt an einem der Enden des Oligonukleotid-Rückgrats bzw. an einer terminalen Base. Als Spacer kann z.B. ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkynylsubstituent verwendet werden. Mögliche einfache Reaktionen zur Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen redoxaktiver Substanz und des so modifizierten Nukleinsäure-Oligomers sind wie unter a) beschrieben, die Amidbildung aus Säure- und Amino-Gruppe, die Esterbildung aus Säure- und Alkohol-Gruppe, die Thioesterbildung aus Säure- und Thio-Alkohol-Gruppe oder die Kondensation von Aldehyd und Amin mit anschließender Reduktion der entstandenen  $\text{CH}=\text{N}$  Bindung zur  $\text{CH}_2\text{-NH}$  Bindung.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das Nukleinsäure-Oligomer durch eine redoxaktive Substanz modifiziert, die Bereiche mit einem überwiegend planaren, in einer Ebene ausgedehnten  $p\text{-}\pi$ -Orbital-System aufweist, wie z. B. das PQQ des Beispiels 1 oder die Chinone der Formel 5 oder 7-12 oder die porphinoide



Strukturen der Formeln 1 - 4 bzw. die Pyridin-Nukleotide der allgemeinen Formel 6 bzw. Derivate dieser redoxaktiven Substanzen. In diesem Fall kann der Spacer, über den die redoxaktive Substanz an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden ist, so gewählt werden, daß sich die Ebene der  $\pi$ -Orbitale der redoxaktiven Substanz parallel zu den p- $\pi$ -Orbitalen der an die redoxaktive Substanz angrenzenden Basen des Nukleinsäure-Oligomers anordnen kann. Diese räumliche Anordnung von redoxaktiver Substanz mit teilweise planarem in einer Ebene ausgedehnten p- $\pi$ -Orbitalen erweist sich als besonders günstig.

c) Bei der Synthese des Nukleinsäure-Oligomers wird eine terminale Base durch die redoxaktive Substanz ersetzt.

Erfindungsgemäß kann die Bindung der redoxaktiven Substanz an das Oligonukleotid wie unter a) und b) beschrieben vor oder nach der Bindung des Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche erfolgen. Die Anbindung der redoxaktiven Substanz an das auf der leitfähigen Oberfläche gebundene Oligonukleotid erfolgt dann ebenfalls wie unter a) und b) beschrieben.

Bei mehreren verschiedenen Oligonukleotid-Kombinationen (Test-Sites) auf einer gemeinsamen Oberfläche ist es vorteilhaft, die (kovalente) Anbindung der redoxaktiven Substanz an die Sonden-Oligonukleotide durch geeignete Wahl der reaktiven Gruppe an den freien Sonden-Oligonukleotidenden der verschiedenen Test-Sites für die gesamte Oberfläche zu vereinheitlichen.

### **Die leitfähige Oberfläche**

Unter dem Begriff "leitfähige Oberfläche" wird erfindungsgemäß jeder Träger mit einer elektrisch leitfähigen Oberfläche beliebiger Dicke verstanden, insbesondere Oberflächen aus Platin, Palladium, Gold, Cadmium, Quecksilber, Nickel, Zink, Kohlenstoff, Silber, Kupfer, Eisen, Blei, Aluminium und Mangan. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die Begriffe "Elektrode" und "leitfähige (Träger-) Oberfläche" alternativ zu "leitfähige Oberfläche" gebraucht.

Daneben können auch beliebige dotierte oder nicht dotierte Halbleiteroberflächen beliebiger Dicke verwendet werden. Sämtliche Halbleiter können als Reinsubstanzen oder als Gemische Verwendung finden. Als nicht einschränkend gemeinte Beispiele seien an dieser Stelle Kohlenstoff, Silizium, Germanium,  $\alpha$ -Zinn, Cu(I)- und Ag(I)-Halogenide beliebiger Kristallstruktur genannt. Geeignet sind ebenfalls sämtliche

binären Verbindungen beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur der Elemente der Gruppen 14 und 16, der Elemente der Gruppen 13 und 15, sowie der Elemente der Gruppen 15 und 16. Daneben können ternäre Verbindungen beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur der Elemente der Gruppen 11, 13 und 16 oder der Elemente der Gruppen 12, 13 und 16 verwendet werden. Die Bezeichnungen der Gruppen des Periodensystems der Elemente beziehen sich auf die IUPAC-Empfehlung von 1985.

### **Bindung eines Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche**

Erfindungsgemäß wird ein Oligonukleotid direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Trägeroberflächenatomen oder -molekülen einer leitfähigen Trägeroberfläche der oben beschriebenen Art verknüpft. Diese Bindung kann auf drei verschiedene Arten durchgeführt werden:

a) Die Oberfläche wird so modifiziert, daß eine reaktive Molekül-Gruppe zugänglich ist. Dies kann durch direkte Derivatisierung der Oberflächenmoleküle, z. B. durch naßchemische oder elektrochemische Oxidation/Reduktion geschehen. So kann z. B. die Oberfläche von Graphitelektroden durch Oxidation naßchemisch mit Aldehyd- oder Carbonsäure-Gruppen versehen werden. Elektrochemisch besteht z. B. die Möglichkeit durch Reduktion in Gegenwart von Aryl-Diazoniumsalzen das entsprechende (funktionalisierte, also mit einer reaktiven Gruppe versehene) Aryl-Radikal oder durch Oxidation in Gegenwart von  $R'CO_2H$  das (funktionalisierte)  $R'$ -Radikal auf der Graphit-Elektrodenoberfläche anzukoppeln. Ein Beispiel der direkten Modifikation von Halbleiteroberflächen ist die Derivatisierung von Siliziumoberflächen zu reaktiven Silanolen, d. h. Silizium-Träger mit  $Si-OR''$  Gruppen an der Oberfläche, wobei  $R''$  ebenso wie  $R'$  einen beliebigen, funktionalisierten, organischen Rest darstellt (z.B. Alkyl-, Alkenyl-, Alkiny-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkinylsubstituent). Alternativ kann die gesamte Oberfläche durch die kovalente Anbindung einer reaktiven Gruppe eines bifunktionalen Linkers modifiziert werden, so daß auf der Oberfläche eine monomolekulare Schicht beliebiger Moleküle entsteht, die, bevorzugt endständig, eine reaktive Gruppe enthalten. Unter dem Begriff "bifunktionaler Linker" wird jedes Molekül beliebiger Kettenlänge, insbesondere der Kettenlängen 2-14, mit zwei gleichen (homo-bifunktional) oder zwei verschiedenen (hetero-bifunktional) reaktiven Molekül-Gruppen verstanden.

Sollen mehrere verschiedene Test-Sites auf der Oberfläche durch Ausnutzen der Methodik der Photolithographie gebildet werden, so ist mindestens eine der

reaktiven Gruppen des homo- oder hetero-bifunktionalen Linkers eine photoinduzierbar reaktive Gruppe, d. h. eine erst durch Lichteinstrahlung bestimmter oder beliebiger Wellenlänge reaktiv werdende Gruppe. Dieser Linker wird so aufgebracht, daß die/eine photoaktivierbare reaktive Gruppe nach der kovalenten Anbindung des Linkers auf der Oberfläche zur Verfügung steht. An die so modifizierte Oberfläche werden die Nukleinsäure-Oligomere kovalent angebunden, wobei diese selbst über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, mit einer reaktiven Gruppe modifiziert sind, bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers. Bei der reaktiven Gruppe des Oligonukleotids handelt es sich um Gruppen, die direkt (oder indirekt) mit der modifizierten Oberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren. Daneben kann an die Nukleinsäure-Oligomere in der Nähe ihres zweiten Endes eine weitere reaktive Gruppe gebunden sein, wobei diese reaktive Gruppe wiederum, wie oben beschrieben, direkt oder über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, angebunden ist. Desweiteren kann die redoxaktive Substanz alternativ zu dieser weiteren reaktiven Gruppe, an diesem zweiten Ende des Nukleinsäure-Oligomers angebunden sein.

b) Das Nukleinsäure-Oligomer, das auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht werden soll, ist über einen kovalent angebundenen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, mit einer oder mehreren reaktiven Gruppe modifiziert, wobei sich diese reaktiven Gruppen bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers befinden. Bei den reaktiven Gruppen handelt es sich um Gruppen, die direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren können. Beispiele hierfür sind: (i) Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) derivatisierte Nukleinsäure-Oligomere der allgemeinen Formel  $(n \times \text{HS-Spacer})\text{-oligo}$ ,  $(n \times \text{R-S-S-Spacer})\text{-oligo}$  oder  $\text{oligo-Spacer-S-S-Spacer-oligo}$ , die mit einer Goldoberfläche unter Ausbildung von Gold-Schwefelbindungen reagieren oder (ii) Amine, die sich durch Chemi- oder Physisorption an Platin- oder Silizium-Oberflächen anlagern. Daneben kann an die Nukleinsäure-Oligomere in der Nähe ihres zweiten Endes eine weitere reaktive Gruppe gebunden sein, wobei diese reaktive Gruppe wiederum, wie oben beschrieben, direkt oder über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, angebunden ist. Desweiteren kann die redoxaktive Substanz alternativ zu dieser weiteren reaktiven Gruppe, an diesem zweiten Ende des Oligonukleotids angebunden sein. Insbesondere Nukleinsäure-Oligomere die mit mehreren Spacer-verbrückten Thiol oder Disulfidbrücken modifiziert sind  $((n \times \text{HS-Spacer})\text{-oligo bzw. } (n \times \text{R-S-S-Spacer})\text{-oligo})$  haben den Vorteil, daß solche Nukleinsäure-Oligomere unter einem

bestimmten Anstellwinkel gegen die leitfähige Oberfläche (Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Helixachse eines doppelsträngigen helikalen Nukleinsäure-Oligomers bzw. zwischen der Oberflächennormalen und der Achse senkrecht zu den Basenpaaren eines doppelsträngigen nicht-helikalen Nukleinsäure-Oligomers) aufgebracht werden können, wenn die die Thiol- bzw. Disulfid-Funktionen an das Nukleinsäure-Oligomer anbindenden Spacer, von einem Ende der Nukleinsäure her betrachtet, eine zunehmende bzw. abnehmende Kettenlänge besitzen.

c) Als reaktive Gruppe am Sonden-Nukleinsäure-Oligomer werden die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen des Oligonukleotid-Rückgrats, insbesondere endständige Gruppen, verwendet. Die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen weisen eine erhöhte Reaktivität auf und gehen daher leicht typische Reaktionen wie z. B. Amidbildung mit (primären oder sekundären) Amino- bzw. Säuregruppen, Esterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Alkoholen bzw. Säuregruppen, Thioesterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Thio-Alkoholen bzw. Säuregruppen oder die Kondensation von Amin und Aldehyd mit anschließender Reduktion der entstandenen  $\text{CH}=\text{N}$  Bindung zur  $\text{CH}_2\text{-NH}$  Bindung ein. Die nötige Kopplungs-Gruppe zur kovalenten Anbindung an die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe ist in diesem Fall ein Teil der Oberflächenderivatisierung mit einer (monomolekularen) Schicht beliebiger Moleküllänge, wie unter a) in diesem Abschnitt beschrieben, oder die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe kann direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren, wie unter b) in diesem Abschnitt beschrieben. Daneben kann an die Oligonukleotide in der Nähe ihres zweiten Endes eine weitere reaktive Gruppe gebunden sein, wobei diese reaktive Gruppe wiederum, wie oben beschrieben, direkt oder über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, angebunden ist. Desweiteren kann die redoxaktive Substanz alternativ zu dieser weiteren reaktiven Gruppe, an diesem zweiten Ende des Nukleinsäure-Oligomers angebunden sein.

Die Bindung des Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche kann alternativ vor oder nach der Anbindung der redoxaktiven Substanz an das Oligonukleotid bzw. vor oder nach Anbinden des mit einer reaktiven Gruppe versehenen Spacers zur Bindung der redoxaktiven Substanz erfolgen. Die Bindung des bereits modifizierten Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche, d. h. die Bindung an die Oberfläche nach der Anbindung der redoxaktiven Substanz an das Oligonukleotid bzw. nach der

Anbindung des mit einer reaktiven Gruppe versehenen Spacers zur Bindung der redoxaktiven Substanz, erfolgt ebenfalls wie unter a) bis c) (Abschnitt "Bindung eines Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche") beschrieben.

Bei der Herstellung der Test-Sites muß bei der Anbindung der Einzelstrang-Oligonukleotide an die Oberfläche darauf geachtet werden, daß zwischen den einzelnen Oligonukleotiden ein genügend großer Abstand verbleibt, um den für eine Hybridisierung mit dem Target-Oligonukleotid nötigen Freiraum zur Verfügung zu stellen. Dazu bieten sich unter anderem zwei verschiedene Vorgehensweisen an:

- 1.) Herstellung einer modifizierten Trägeroberfläche durch Anbindung eines hybridisierten Oligonukleotids, also eine Trägeroberflächen-Derivatisierung mit hybridisiertem Sonden-Oligonukleotid statt mit Einzelstrang-Sonden-Oligonukleotid. Der zur Hybridisierung verwendete Oligonukleotidstrang ist unmodifiziert (die Oberflächenanbindung wird durchgeführt wie unter a) - c) im Abschnitt "Bindung eines Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche" beschrieben). Anschließend wird der hybridisierte Oligonukleotid-Doppelstrang thermischer dehybridisiert, wodurch eine Einzelstrang-Oligonukleotid modifizierte Trägeroberfläche mit größerem Abstand zwischen den Proboligonukleotiden hergestellt wird.
  - 2.) Herstellung einer modifizierten Trägeroberfläche durch Anbindung eines Einzelstrang- oder Doppelstrang-Oligonukleotids, wobei während der Trägeroberflächen-Derivatisierung ein geeigneter monofunktionaler Linker zugesetzt wird, der neben dem Einzelstrang- oder Doppelstrang-Oligonukleotid auch an die Oberfläche gebunden wird (die Oberflächenanbindung wird durchgeführt wie unter a) - c) im Abschnitt "Bindung eines Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche" beschrieben). Erfindungsgemäß hat der monofunktionale Linker eine Kettenlänge, die der Kettenlänge des Spacers zwischen Trägeroberfläche und Oligonukleotid identisch ist oder um maximal acht Kettenatome abweicht. Bei der Verwendung von Doppelstrang-Oligonukleotid zur Trägeroberflächen-Derivatisierung wird nach der Anbindung des Doppelstrang-Oligonukleotids und des Linkers an die Trägeroberfläche der hybridisierte Oligonukleotid-Doppelstrang thermischer dehybridisiert, wie oben unter 1.) beschrieben. Durch die gleichzeitige Anbindung eines Linkers an die Oberfläche wird der Abstand zwischen den ebenfalls an die Oberfläche gebundenen Einzel- oder Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomeren vergrößert. Im Falle der Verwendung von Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer wird dieser Effekt durch die anschließende thermische Dehybridisierung noch verstärkt.
- Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäureoligomerhybriden**

Vorteilhafterweise werden gemäß dem Verfahren zur elektrochemischen Detektion mehrere Sonden-Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz, idealerweise alle nötigen Kombinationen des Nukleinsäure-Oligomers, auf einem Oligomer- oder DNA-Chip aufgebracht, um die Sequenz eines beliebigen Target-Oligomers oder einer (fragmentierten) Target-DNA sicher zu detektieren bzw. um Mutationen im Target aufzuspüren und sequenzspezifisch nachzuweisen. Dazu werden auf einer leitfähigen Trägeroberfläche die Trägeroberflächenatome oder -moleküle eines definierten Bereichs (einer Test-Site) mit DNA-/RNA-/PNA-Oligonukleotiden bekannter, aber beliebiger Sequenz, wie oben beschrieben, verknüpft. In einer allgemeinsten Ausführungsform kann aber der DNA-Chip auch mit einem einzigen Sonden-Oligonukleotid derivatisiert werden. Als Sonden-Oligonukleotide werden Nukleinsäure-Oligomere (DNA-, RNA- oder PNA-Fragmente) der Basenlänge 3 bis 50, bevorzugt der Länge 5 bis 30, besonders bevorzugt der Länge 7 bis 25 verwendet. Erfindungsgemäß wird an die Sonden-Oligonukleotide entweder vor oder nach deren Bindung an die leitfähige Oberfläche eine redoxaktive Substanz gebunden.

Erfolgt die Modifikation der Sonden-Oligonukleotide vor der Bindung an die leitfähige Oberfläche, so werden die bereits modifizierten Sonden-Oligonukleotide wie oben beschrieben an die leitfähige Oberfläche gebunden. Alternativ werden die nicht modifizierten, an die leitfähige Oberfläche gebundenen Sonden-Oligonukleotide am zweiten, freien Ende der Oligonukleotidkette direkt oder indirekt über einen Spacer mit einer redoxaktive Substanz modifiziert.

In beiden Fällen entsteht ein Oberflächen-Hybrid der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Redox (Figur 3). Die elektrische Kommunikation zwischen der (leitfähigen) Trägeroberfläche und dem über ein Einzelstrang-Oligonukleotid verbrückten redoxaktiven Substanz ("Redox") in der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Redox ist schwach oder gar nicht vorhanden. Die Verbrückungen können natürlich auch ohne Spacer oder mit nur einem Spacer (Elek-ss-oligo-Spacer-Redox bzw Elek-Spacer-ss-oligo-Redox) durchgeführt werden.

In einem nächsten Schritt werden die Test-Sites mit der zu untersuchenden Oligonukleotid-Lösung (Target) in Kontakt gebracht. Dabei kommt es nur in dem Fall zur Hybridisierung, in dem die Lösung Oligonukleotid-Stränge enthält, die zu den an die leitfähige Oberfläche gebundenen Sonden-Oligonukleotiden komplementär, oder zumindest in weiten Bereichen komplementär sind. Im Falle der Hybridisierung zwischen Sonden- und Target-Oligonukleotid kommt es zu einer verstärkten Leitfähigkeit zwischen der Trägeroberfläche und der redoxaktiven Substanz, da

diese nunmehr über das aus einem Doppelstrang bestehende Oligonukleotid verbrückt sind (in Figur 3 an einem Beispiel der Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Redox schematisch gezeigt).

Durch die Veränderung der elektrischen Kommunikation zwischen der (leitfähigen) Trägeroberfläche und der redoxaktiven Substanz aufgrund der Hybridisierung von Sonden-Oligonukleotid und dem dazu komplementären Oligonukleotid-Strang (Target) kann somit ein sequenzspezifisches Hybridisierungsereignis durch elektrochemische Verfahren wie z. B. Cyclovoltametrie, Amperometrie oder Leitfähigkeitsmessungen detektiert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine redoxaktive Substanz verwendet, die Bereiche mit einem überwiegend planaren, in einer Ebene ausgedehnten  $p$ - $\pi$ -Orbital-System aufweist, wie z. B. das PQQ des Beispiels 1 (vgl. Figur 3), oder die Chinone der Formel 5 oder 7-12 oder die porphinoide Strukturen der Formeln 1 - 4, die Pyridin-Nukleotide der allgemeinen Formel 6 sowie Derivate dieser redoxaktiven Substanzen. In diesem Fall wird der Spacer zwischen Nukleinsäure-Oligomer und der redoxaktiven Substanz so gewählt, daß sich die Ebene der  $\pi$ -Orbitale der redoxaktiven Substanz parallel zu den  $p$ - $\pi$ -Orbitalen des an die redoxaktive Substanz angrenzenden Basenpaars des mit Komplementärstrang hybridisierten Nukleinsäure-Oligomers anordnen kann. Diese räumliche Anordnung von redoxaktiver Substanz mit teilweise planarem in einer Ebene ausgedehnten  $p$ - $\pi$ -Orbitalen erweist sich für die elektrische Leitfähigkeit der Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomere als besonders günstig.

Bei der Cyclovoltametrie wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode zeitabhängig linear verändert. Ausgehend von einem Potential bei dem keine Elektrooxidation oder -reduktion stattfindet, wird das Potential solange verändert bis die redoxaktive Substanz oxidiert oder reduziert wird (also Strom fließt). Nach Durchlaufen des Oxidations- bzw. Reduktionsvorgangs, der in der Strom/Spannungskurve einen zunächst ansteigenden Strom, einen Maximalstrom (Peak) und dann einen allmählich abfallenden Strom erzeugt, wird die Richtung des Potentialvorschubs umgekehrt. Im Rücklauf wird dann das Verhalten der Produkte der Elektrooxidation oder -reduktion aufgezeichnet.

Eine alternative elektrische Detektionsmethode, die Amperometrie, wird dadurch ermöglicht, daß die redoxaktive Substanz durch Anlegen eines geeigneten, konstant gehaltenen Elektrodenpotentials zwar elektrooxidiert (elektroreduziert) wird, die Rereduktion (Reoxidation) der redoxaktiven Substanz in den ursprünglichen Zustand aber nicht durch Änderung des Elektrodenpotentials erreicht wird, wie in der

Cyclovoltametrie, sondern durch ein der Targetlösung zugesetztes geeignetes Reduktionsmittel (Oxidationsmittel), wodurch der Stromkreis des Gesamtsystems geschlossen wird. Solange Reduktionsmittel (Oxidationsmittel) vorhanden ist bzw. solange verbrauchtes Reduktionsmittel (Oxidationsmittel) an der Gegenelektrode rereduziert (reoxidiert) wird, fließt Strom, der amperometrisch detektiert werden kann und der proportional zur Zahl der Hybridisierungsereignisse ist.

### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispiels im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen

- Fig. 1 Schematische Darstellung des Sanger-Verfahrens der Oligonukleotid-Sequenzierung;
- Fig. 2 Schematische Darstellung der Oligonukleotid-Sequenzierung durch Hybridisierung auf einem Chip;
- Fig. 3 Schematische Darstellung des Oberflächen-Hybrids der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Redox mit einem 12 Bp Sonden-Oligonukleotid der exemplarischen Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' (links) und Au-S-ss-oligo-PQQ im hybridisierten Zustand als Ausführungsbeispiel einer Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Redox, wobei nur ein Teil des Sonden-Oligonukleotids mit hybridisierten Komplementärstrang gezeigt ist (rechts) und die Anbindung des Oligonukleotids an die Oberfläche über einen -S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- Spacer sowie die Anbindung der redoxaktiven Substanz PQQ über den Spacer -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH- erfolgte;
- Fig. 4 Cyclovoltogramm einer Test-Site aus Au-S-ss-oligo-PQQ (gepunktet) im Vergleich zu einer identischen Test-Site mit vollständig hybridisiertem Target (Au-S-ds-oligo-PQQ, durchgezogene Linie);
- Fig. 5 Cyclovoltogramm einer Test-Site mit vollständig hybridisiertem Target (Au-S-ds-oligo-PQQ) (durchgezogene Linie) im Vergleich zu einer Test-Site mit hybridisiertem Target, das 2 Basenpaar Mismatches aufweist (Au-S-ds-oligo-PQQ mit 2 Bp Mismatches, gestrichelt).



### Wege zur Ausführung der Erfindung

Eine exemplarische Test-Site mit hybridisiertem Target (Au-S-ds-oligo-PQQ) der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-Redox ist in Figur 3 dargestellt. In dem Beispiel der Figur 3 ist die Trägeroberfläche eine Gold-Elektrode. Die Verbindung zwischen Gold-Elektrode und Sonden-Oligonukleotid wurde mit dem Linker  $(\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{S})_2$  aufgebaut, der mit der endständigen Phosphatgruppe am 3' Ende zu  $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2-\text{S-S}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$  verestert wurde und nach homolytischer Spaltung der S-S Bindung an der Gold-Oberfläche je eine Au-S Bindung bewirkte, womit 2-Hydroxy-mercaptoethanol und Mercaptoethanol-verbrücktes Oligonukleotid auf der Oberfläche koadsorbiert wurde. Die redoxaktive Substanz im Beispiel der Figur 3 ist tricarboxylisches Pyrrolo-Chinolin-Chinon (PQQ), wobei eine der drei Carbonsäurefunktionen des PQQ (im Beispiel die C-7-CO<sub>2</sub>H-Funktion) zur kovalenten Anbindung des PQQ an das Sonden-Oligonukleotid verwendet wurde (Amidbildung unter Wasserabspaltung mit der terminalen Aminofunktion des an die C-5-Position des 5'-Thymins angebundenen  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  Spacers). Sowohl freies, unmodifiziertes PQQ als auch über einen kurzen Spacer der Kettenlänge 1-6, wie z. B.  $-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$ , oder über (modifiziertes) Doppelstrang-Oligonukleotid mit der Trägeroberfläche verbrücktes PQQ wird, z. B. in HEPES Puffer mit 0.7 molarem Zusatz von TEATFB (siehe Abkürzungen), im Potentialbereich  $0,7 \text{ V} \geq \varphi \geq 0,0 \text{ V}$ , gemessen gegen Normalwasserstoffelektrode, selektiv reduziert und reoxidiert.

Die elektrische Kommunikation zwischen der (leitfähigen) Trägeroberfläche und dem über Einzelstrang-Oligonukleotid verbrückten Redoxpaar in der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-Redox ist schwach oder gar nicht vorhanden. Für die exemplarische Test-Site Au-S-ss-oligo-PQQ (mit 12-Bp Sonden-Oligonukleotiden) ist dies anhand der Cyclovoltametrie (Figur 4) gezeigt. Ohne an eine theoretische Beschreibung gebunden sein zu wollen, wird angenommen, daß die negativen Ladungen des Phosphatgerüsts eine gegenseitig Abstoßung der Oligonukleotid-Einzelstränge bedingen und so einen Aufbau der -Spacer-ds-oligo-Spacer-Redox Kette (in Richtung Helixachse) unter einem Winkel  $\phi < 70^\circ$  zur Normalen der Trägeroberfläche („stehende Röhren“) erzwingen. Die (hybridisierte) Test-Site Au-S-ds-oligo-PQQ der Figur 3 weist einen Aufbau mit  $\phi = 30^\circ$  auf. Aufgrund der Länge der -Spacer-ds-oligo-Spacer-Redox Kette (z. B. ca. 40 Å Länge eines 12-Basenpaar-Oligonukleotids; die Spacer und das angebundene PQQ sind rund 10 Å lang)

entsteht bei  $\phi < 70^\circ$  zwischen Trägeroberfläche und redoxaktiver Substanz ein Abstand von  $> 17 \text{ \AA}$ . Dadurch kann ein direkter Elektron- oder Lochtransfer zwischen Trägeroberfläche und redoxaktiver Substanz ausgeschlossen werden. Durch Behandlung der Test-Site(s) mit einer zu untersuchenden Oligonukleotid-Lösung, kommt es, im Falle der Hybridisierung zwischen Sonde und Target zu einer verstärkten Leitfähigkeit zwischen der Trägeroberfläche und dem über das Doppelstrang-Oligonukleotid verbrückten Redoxpaar. Die Änderung der Leitfähigkeit äußert sich cyclovoltammetrisch in einem deutlichen Stromfluß zwischen Trägeroberfläche und redoxaktiver Substanz (Figur 4). Damit ist es möglich, die sequenzspezifische Hybridisierung des Targets mit den Sonden-Oligonukleotiden durch elektrochemische Verfahren wie z. B. cyclische Voltametrie zu detektieren.

Daneben können fehlerhafte Basenpaarungen (Basenpaar Mismatches) durch eine geänderte cyclovoltammetrische Charakteristik erkannt werden (Figur 5). Ein Mismatch äußert sich in einem größeren Potentialabstand zwischen den Strommaxima der Elektoreduktion und der Elektrooxidation (Umkehrung der Elektoreduktion bei umgekehrter Potentialvorschubrichtung) bzw. der Elektrooxidation und Elektrorereduktion in einem cyclovoltammetrisch reversiblen Elektronenübertragungsprozess zwischen der elektrisch leitenden Trägeroberfläche und der redoxaktiven Substanz. Dieser Umstand wirkt sich vor allem in der amperometrischen Detektion günstig aus, da dort der Strom bei einem Potential getestet werden kann, bei dem zwar das perfekt hybridisierende Oligonukleotid-Target signifikant Strom liefert, nicht aber das fehlerhaft gepaarte Oligonukleotid-Target. Im Beispiel der Figur 5 ist dies bei einem Potential  $E-E_0$  von ca. 0,03 V möglich.

**Beispiel 1:** Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode Au-S-ds-oligo-PQQ. Die Herstellung von Au-S-ds-oligo-PQQ gliedert sich in 4 Teilabschnitte, nämlich Darstellung der Trägeroberfläche, Hybridisierung des Sonden-Oligonukleotids mit dem komplementären Doppelstrang (Hybridisierungsschritt), Derivatisierung der Trägeroberfläche mit dem Doppelstrang-Oligonukleotid (Inkubationsschritt) und Anbindung der redoxaktiven Substanz (Redoxschritt).

Das Trägermaterial für die kovalente Anbindung der Doppelstrang-Oligonukleotide bildet ein ca. 100nm dünner Gold-Film auf Mica (Muskovit Plättchen). Dazu wurde in einer elektrischen Entladungskammer frisch gespaltenes Mica mit einem Argon-Ionenplasma gereinigt und durch elektrische Entladung Gold (99.99%) in einer Schichtdicke von ca. 100nm aufgebracht. Anschließend wurde der Gold-Film mit 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , / 70 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  von Oberflächenverunreinigungen befreit (Oxidation organischer Ablagerungen) und für ca. 20 Minuten in Ethanol getaucht, um an der

Oberfläche adsorbierten Sauerstoff zu verdrängen. Nach Abspülen der Trägeroberfläche mit bidestilliertem Wasser wird auf die horizontal gelagerte Trägeroberfläche eine vorher bereitete  $1 \times 10^{-4}$  molare Lösung des (modifizierten) Doppelstrang-Oligonukleotids aufgetragen, so daß die komplette Trägeroberfläche benetzt wird (Inkubationsschritt, siehe auch unten).

Zur Bereitung der ds-Oligonukleotid Lösung wurde ein doppelt modifiziertes 12 Bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' verwendet, das an der Phosphatgruppe des 3' Endes mit  $(\text{HO}-(\text{CH}_2)_2\text{S})_2$  zum  $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2\text{S-S}-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$  verestert ist. Am 5'-Ende ist die endständige Base des Oligonukleotids, Thymin, am C-5 Kohlenstoff mit  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  modifiziert. Eine  $2 \times 10^{-4}$  molare Lösung dieses Oligonukleotids im Hybridisierungspuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5 mit 0.7 molarem Zusatz von TEATFB, siehe Abkürzungen) wurde mit einer  $2 \times 10^{-4}$  molaren Lösung des (unmodifizierten) komplementären Strang im Hybridisierungspuffer bei Raumtemperatur für ca. 2h hybridisiert (Hybridisierungsschritt). Während einer Reaktionszeit von ca. 12-24h wurde der Disulfidspacer  $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2\text{S-S}-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$  des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit den Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1:1 Koadsorption des ds-Oligonukleotids und des 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt (Inkubationsschritt).

Die so mit einer dichten (1:1) Monolayer aus ds-Oligonukleotid und 2-Hydroxy-mercaptoethanol modifizierte Goldelektrode wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit einer Lösung von  $3 \times 10^{-3}$  molarem Chinon PQQ,  $10^{-2}$  molarem EDC und  $10^{-2}$  molarem sulfo-NHS in HEPES Puffer benetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 1h bindet der  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  Spacer das PQQ kovalent an (Amidbildung zwischen der Aminogruppe des Spacers und einer Säurefunktion des PQQ, Redoxschritt).

Die Aufklärung der Oberflächenbeschaffenheit mit XPS (X-Ray Photoelektronenspektroskopie) ergab eine maximal dicht gepackte Monolayer aus 1:1 koadsorbiertem ds-Oligonukleotid und 2-Hydroxy-mercaptoethanol ( $4.7 \times 10^{12}$  ds-Oligonukleotide/ $\text{cm}^2$ ), wobei die lange Achse (Richtung der Helixachse) der ds-Oligonukleotide mit der Flächennormalen der Goldoberfläche einen Winkel von  $\phi \approx 30^\circ$  bildet.

**Beispiel 2:** Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode Au-S-ss-oligo-PQQ. Analog zur Darstellung des Systems Au-S-ds-oligo-PQQ wird die Trägeroberfläche mit modifiziertem Einzelstrang-Oligonukleotid derivatisiert, wobei lediglich auf die

Hybridisierung des modifizierten Oligonukleotids der Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' mit seinem komplementären Strang verzichtet wurde und im Inkubationsschritt nur das doppelt modifizierte 12 Bp Einzelstrang-Sonden-Oligonukleotid (siehe Beispiel 1) als  $1 \times 10^{-4}$  molare Lösung in Wasser und in Gegenwart von  $10^{-2}$  molarem Tris,  $10^{-3}$  molarem EDTA und 0.7 molarem TEATFB (oder 1 molarem NaCl) bei pH 7.5 verwendet wurde. Der Redoxschritt wurde, wie in Beispiel 1 angegeben, durchgeführt.

**Beispiel 3:** Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode Au-S-ds-oligo-PQQ mit 2-Bp-Mismatches. Die Herstellung einer Trägeroberfläche derivatisiert mit modifiziertem Doppelstrang-Oligonukleotid wurde analog zur Darstellung des Systems Au-S-ds-oligo-PQQ durchgeführt, wobei lediglich bei der Hybridisierung des modifizierten Oligonukleotids der Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' ein komplementärer Strang verwendet wurde (Sequenz: 5'-ATCAGATTTCGT-3'), bei dem die eigentlich komplementären Basen Nr. 6 und 7 (vom 5'-Ende gezählt) von C nach A bzw. von C nach T modifiziert wurden, um so zwei Basenpaar Mismatches einzuführen.

**Beispiel 4:** Herstellung einer Oligonukleotid-Elektrode Au-S-ss-oligo-PQQ mit erhöhtem Inter-Oligonukleotid-Abstand. Bei der Herstellung der Test-Sites muß bei der Derivatisierung der Trägeroberfläche mit Einzelstrang-Sonden-Oligonukleotid darauf geachtet werden, daß zwischen den angebundenen Einzelsträngen genügend Platz verbleibt, um eine Hybridisierung mit dem Target-Oligonukleotid zu ermöglichen. Dazu bieten sich drei verschiedene Vorgehensweisen an: (a) Herstellung einer Au-S-ds-oligo-PQQ Elektrode wie in Beispiel 1 beschrieben mit anschließender thermischer Dehybridisierung der Doppelstränge bei Temperaturen von  $T > 40^\circ\text{C}$ . (b) Herstellung einer Au-ss-oligo-PQQ Elektrode wie unter Beispiel 2 beschrieben, aber im Inkubationsschritt zur Derivatisierung der Goldoberfläche mit (doppelt derivatisiertem) Einzelstrang-Oligonukleotid wird 2-Hydroxy-mercaptoethanol oder ein anderer Thiol- oder Disulfid-Linker geeigneter Kettenlänge  $10^{-5}$  bis  $10^{-1}$  molar zugesetzt (je nach gewünschtem Inter-Oligonukleotid-Abstand), das gemeinsam mit dem Einzelstrang Oligonukleotid an die Goldoberfläche koadsorbiert. (c) Herstellung einer Au-ss-oligo-PQQ Elektrode wie unter Beispiel 2 beschrieben, aber unter Weglassen des 0.7 molaren Zusatzes an Elektrolyten (im Beispiel TEATFB) im Inkubationsschritt zur Derivatisierung der Goldoberfläche mit (doppelt derivatisiertem) Einzelstrang-Oligonukleotid. Die Phosphatgruppen und Basen-Sickstoffatome des Oligonukleotids sind durch die Abwesenheit des Salzes elektrostatisch nicht abgeschirmt und wechselwirken stark mit der Goldoberfläche. Dadurch kommt es zu einer flachen Anlagerung der Oligonukleotide auf der Elektrodenoberfläche ( $\phi > 60^\circ$ ) und es werden pro Flächeneinheit deutlich weniger Oligonukleotide gebunden. Anschließend können die Oligonukleotide wieder in die

gewünschte Position gebracht werden, indem in einem 2. Inkubationsschritt (vor oder nach Anbringen des PQQ) 2-Hydroxy-mercaptoethanol oder ein anderer Thiol- oder Disulfid-Linker geeigneter Kettenlänge kovalent an die noch freien Oberflächen-Goldatome angebunden wird. Dazu wird die weniger dicht mit Einzelstrang-Oligonukleotid belegte Elektrode vor oder nach Modifikation mit PQQ (Au-S-ss-oligo bzw. Au-S-ss-oligo-PQQ) mit einer ca.  $5 \times 10^{-2}$  molaren Lösung des 2-Hydroxy-mercaptoethanols oder eines anderen Thiol- oder Disulfid-Linkers geeigneter Kettenlänge in Ethanol oder HEPES Puffer (bzw. einem Gemisch daraus, abhängig von der Löslichkeit des Thiols) benetzt und 2-24h inkubiert.

**Beispiel 5:** Durchführung der cyclovoltammetrischen Messungen. Die cyclovoltammetrischen Messungen wurden mit einem Computer-kontrolliertem Bipotentiostaten (CH Instruments, Model 832) bei Raumtemperatur in einer Standard Zelle mit 3-Elektroden-Anordnung vermessen. Die modifizierte Goldelektrode wurde als Arbeitselektrode verwendet, als Hilfselektrode (Gegenelektrode) diente ein Platindraht und als Referenzelektrode zur Potentialbestimmung wurde eine über eine Luggin Kapillare vom Probenraum abgetrennte Ag/AgCl-Elektrode mit interner gesättigter KCl Lösung verwendet. Als Elektrolyt diente 0.7 molares TEATFB oder 1 molares NaCl. Ein Cyclovoltogramm der Au-S-ds-oligo-PQQ Elektrode im Vergleich zu einer Au-S-ss-oligo-PQQ Elektrode ist in Figur 4 gezeigt, die Auswirkung der 2 Bp Mismatches auf das Cyclovoltogramm der Au-S-ds-oligo-PQQ Elektrode ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Potentiale sind jeweils als  $E-E_0$ , also relativ zum Halbstufenpotential angegeben.

Aus Figur 4 ist ein deutlich erhöhter Stromfluß bei Vorliegen eines Doppelstrang-Oligonukleotids gegenüber der nicht hybridisierten Form zu erkennen. Dadurch können sequenzspezifische Hybridisierungsereignisse detektiert werden. Aus Figur 5 wird deutlich, daß bei Hybridisierung mit einem Target-Oligonukleotid-Strang, der 2 Basenpaar-Mismatches aufweist zum einen ein geringerer Strom fließt, zum anderen die Differenz der Strommaxima vergrößert wird.

### Patentansprüche

1. Durch Anbindung einer redoxaktiven Substanz modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer, dadurch gekennzeichnet, daß die redoxaktive Substanz bei einem Potential  $\varphi$  selektiv oxidierbar und reduzierbar ist, wobei  $\varphi$  der Bedingung  $2,0 \text{ V} \geq \varphi \geq -2,0 \text{ V}$ , gemessen gegen Normalwasserstoffelektrode, genügt.
2. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 1, wobei als redoxaktive Substanz ein Farbstoff verwendet wird, insbesondere ein Flavin-Derivat, ein Porphyrin-Derivat, ein Chlorophyll-Derivat oder ein Bakteriochlorophyll-Derivat.
3. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 1, wobei als redoxaktive Substanz ein Chinon, insbesondere ein Pyrrolo-Chinolin-Chinon (PQQ), ein 1,4-Benzochinon, ein 1,2-Naphtochinon, ein 1,4-Naphtochinon oder ein 9,10-Anthrachinon verwendet wird.
4. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die redoxaktive Substanz kovalent alternativ an eine der Phosphorsäure-, Carbonsäure- oder Amin-Einheiten, an eine der Zucker-Einheiten oder an eine der Basen des Nukleinsäure-Oligomers angebunden ist, insbesondere an eine enständige Einheit des Nukleinsäure-Oligomers.
5. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die redoxaktive Substanz kovalent an einen verzweigten oder unverzweigten Molekülteil beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge angebunden ist und der verzweigte oder unverzweigte Molekülteil alternativ an eine der Phosphorsäure-, Carbonsäure- oder Amin-Einheiten, an eine der Zucker-Einheiten oder an eine der Basen des Nukleinsäure-Oligomers angebunden ist, insbesondere an eine enständige Einheit des Nukleinsäure-Oligomers.
6. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 5, wobei die redoxaktive Substanz kovalent an einen verzweigten oder unverzweigten Molekülteil angebunden ist, dessen kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den verbundenen Strukturen 1 bis 14 Atome umfaßt.
7. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer sequenzspezifisch Einzelstrang-DNA, RNA und/oder PNA binden kann.

8. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 7, wobei das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer ein Desoxyribonukleinsäure-, Ribonukleinsäure-, ein Peptidnukleinsäure-Oligomer oder ein Nukleinsäure-Oligomer mit strukturell analogem Rückgrat ist.
9. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die redoxaktive Substanz an ein Nukleinsäure-Oligomer gebunden wird, wobei die Anbindung an eine Phosphorsäure- oder Carbonsäure-Gruppe des Nukleinsäure-Oligomers durch Amidbildung mit (primären oder sekundären) einer Aminogruppe der redoxaktiven Substanz, durch Esterbildung mit einer (primären, sekundären oder tertiären) Alkohol-Gruppe der redoxaktiven Substanz, oder durch Thioesterbildung mit einer (primären, sekundären oder tertiären) Thio-Alkohol-Gruppe der redoxaktiven Substanz bzw. durch Kondensation einer Amin-Gruppe des Nukleinsäure-Oligomers mit einer Aldehyd-Gruppe der redoxaktiven Substanz erfolgt.
10. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers gemäß den Ansprüchen 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die redoxaktive Substanz an einen verzweigten oder unverzweigten Molekülteil beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge kovalent angebunden wird, wobei die Anbindung an eine Phosphorsäure- oder Carbonsäure-Gruppe des verzweigten oder unverzweigten Molekülteils durch Amidbildung mit (primären oder sekundären) einer Aminogruppe der redoxaktiven Substanz, durch Esterbildung mit einer (primären, sekundären oder tertiären) Alkohol-Gruppe der redoxaktiven Substanz, oder durch Thioesterbildung mit einer (primären, sekundären oder tertiären) Thio-Alkohol-Gruppe der redoxaktiven Substanz bzw. durch Kondensation einer Amin-Gruppe des verzweigten oder unverzweigten Molekülteils mit einer Aldehyd-Gruppe der redoxaktiven Substanz erfolgt.
11. Modifizierte leitfähige Oberfläche, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 an eine leitfähige Oberfläche angebunden sind.
12. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 11, wobei die Oberfläche aus einem Metall oder einer Metallegierung besteht, insbesondere einem Metall ausgewählt aus der Gruppe Platin, Palladium, Gold, Cadmium, Quecksilber,

Nickel, Zink, Kohlenstoff, Silber, Kupfer, Eisen, Blei, Aluminium, Mangan und deren Mischungen.

13. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 11, wobei die Oberfläche aus einem Halbleiter besteht, insbesondere einem Halbleiter ausgewählt aus der Gruppe Kohlenstoff, Silizium, Germanium und  $\alpha$ -Zinn.
14. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 11, wobei die Oberfläche aus einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 14 und 16, einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 13 und 15, einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 15 und 16, oder einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 11 und 17 besteht, insbesondere aus einem Cu(I)-Halogenid oder einem Ag(I)-Halogenid.
15. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 11, wobei die Oberfläche aus einer ternären Verbindung der Elemente der Gruppen 11, 13 und 16 oder einer ternären Verbindung Elemente der Gruppen 12, 13 und 16 besteht.
16. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach den Ansprüchen 11 bis 15, wobei die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere an die leitfähige Oberfläche kovalent oder durch Physisorption angebunden sind.
17. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 16, wobei alternativ eine der Phosphorsäure-, Carbonsäure- oder Amin-Einheiten, eine der Zucker-Einheiten oder eine der Basen des Nukleinsäure-Oligomers kovalent oder durch Physisorption an die leitfähige Oberfläche angebunden ist, insbesondere eine enständige Einheit des Nukleinsäure-Oligomers.
18. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach einem der Ansprüche 11 bis 15, wobei an die leitfähige Oberfläche verzweigte oder unverzweigte Molekülteile beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge kovalent oder durch Physisorption angebunden sind und die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere kovalent an diese Molekülteile angebunden sind.
19. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 18, wobei das verzweigte oder unverzweigte Molekülteil eine kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den verbundenen Strukturen von 1 bis 14 Atome umfaßt.



20. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach den Ansprüchen 18 und 19, wobei der verzweigte oder unverzweigte Molekülteil alternativ an eine der Phosphorsäure-, Carbonsäure- oder Amin-Einheiten, an eine der Zucker-Einheiten oder an eine der Basen des Nukleinsäure-Oligomers kovalent gebunden ist, insbesondere an eine enständige Einheit des Nukleinsäure-Oligomers.
21. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach den Ansprüchen 11 bis 20, wobei ein oder mehrere Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 auf eine leitfähige Oberfläche aufgebracht werden.
22. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach den Ansprüchen 11 bis 20, wobei eine oder mehrere Arten von Nukleinsäure-Oligomeren auf eine leitfähige Oberfläche gebunden werden und ausschließlich die an die leitfähige Oberfläche gebundenen Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung einer redoxaktiven Substanz an die Nukleinsäure-Oligomere modifiziert werden.
23. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach Anspruch 22, wobei die Anbindung der redoxaktiven Substanz an das Nukleinsäure-Oligomer durch Reaktion der redoxaktiven Substanz mit einer Phosphorsäure-Einheit, einer Zucker-Einheit oder einer der Basen des Nukleinsäure-Oligomers erfolgt, insbesondere durch Reaktion mit einer enständigen Einheit des Nukleinsäure-Oligomers.
24. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach Anspruch 22, wobei die redoxaktive Substanz kovalent an einen verzweigten oder unverzweigten Molekülteil beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge angebunden wird und der verzweigte oder unverzweigte Molekülteil alternativ an eine der Phosphorsäure-, Carbonsäure- oder Amin-Einheiten, an eine der Zucker-Einheiten oder an eine der Basen des Nukleinsäure-Oligomers angebunden wird, insbesondere an eine enständige Einheit des Nukleinsäure-Oligomers.
25. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach den Ansprüchen 21 bis 24, wobei das Nukleinsäure-Oligomer oder das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomerstrang hybridisiert wird und in Form des Doppelstranghybrids auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht wird.

26. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach den Ansprüchen 21 bis 25, wobei das Nukleinsäure-Oligomer oder das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer in Gegenwart von weiteren chemischen Verbindungen, die ebenfalls an die leitfähige Oberfläche angebunden werden, auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht wird.
27. Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen, dadurch gekennzeichnet, daß eine leitfähige Oberfläche, wie in den Ansprüchen 11 bis 20 definiert, mit Nukleinsäure-Oligomeren in Kontakt gebracht wird mit Nukleinsäure-Oligomeren in Kontakt gebracht werden und anschließend eine Detektion der elektrischen Kommunikation zwischen der redoxaktiven Einheit und der jeweiligen leitfähigen Oberfläche erfolgt.
28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die Detektion cyclovoltametrisch, amperometrisch oder durch Leitfähigkeitsmessung erfolgt.

Fig. 1a

1/4

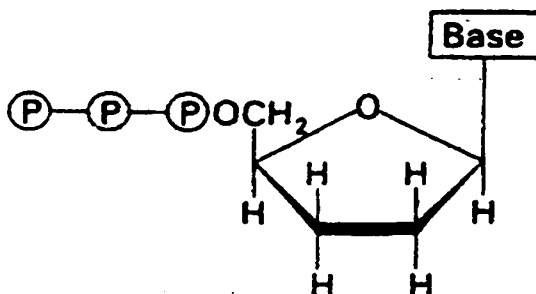


Fig. 1b

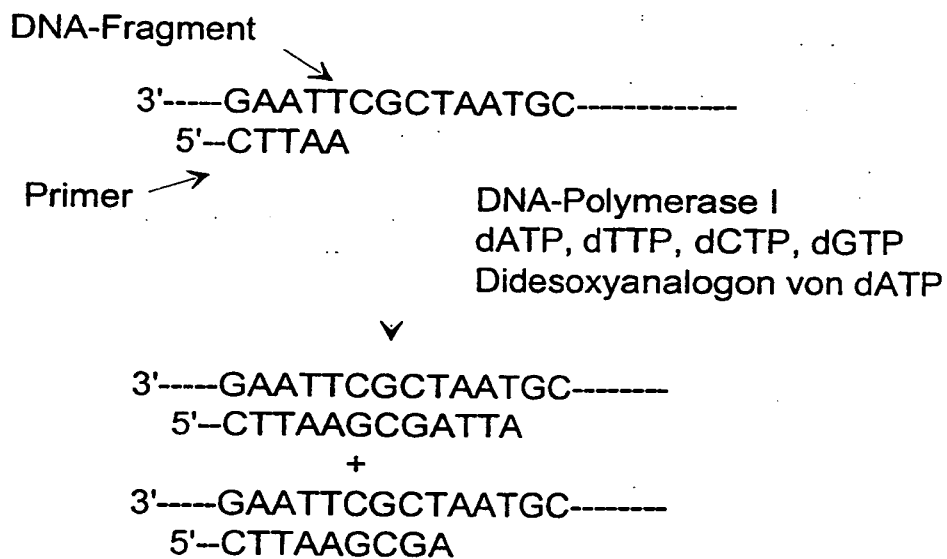
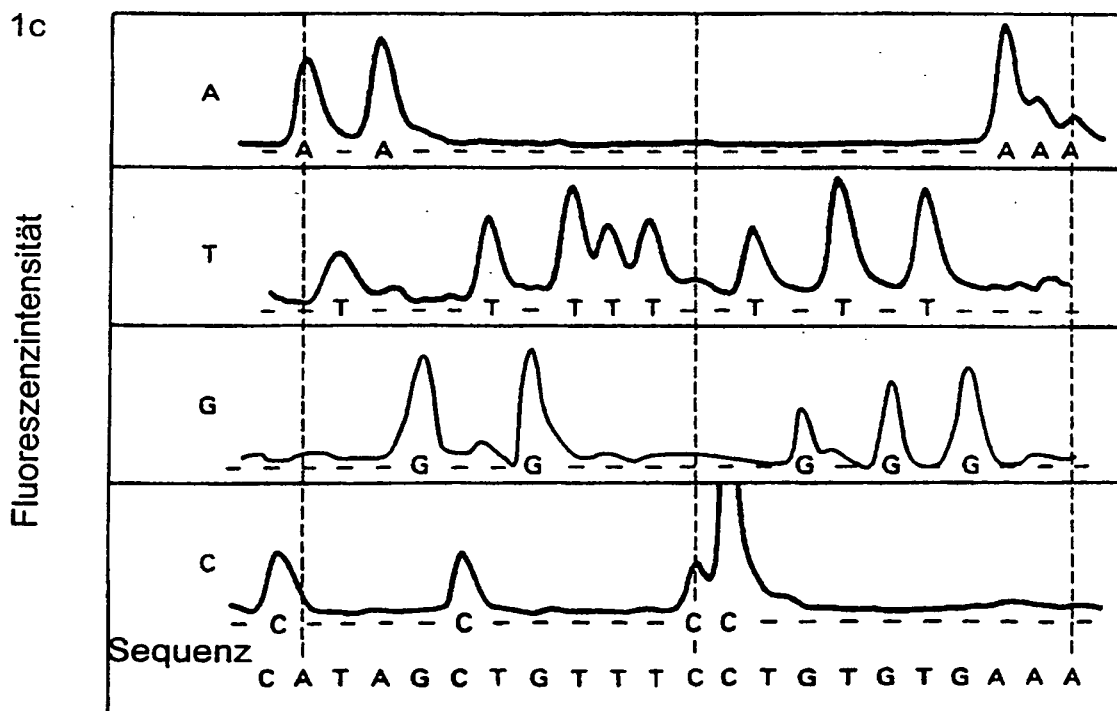


Fig. 1c

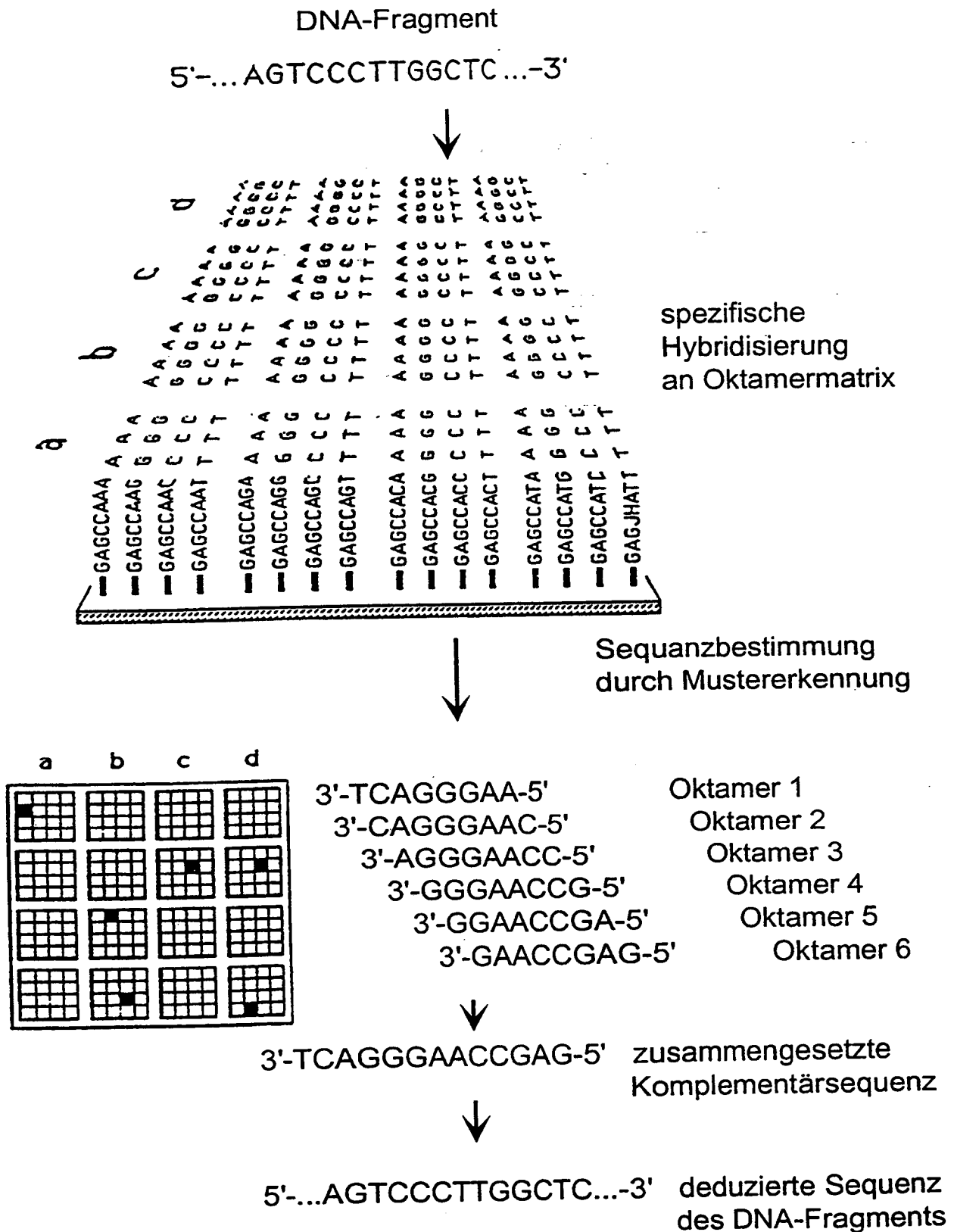


Länge des Oligonukleotids

**ERSATZBLATT (REGEL 26)**

Fig. 2

2/4



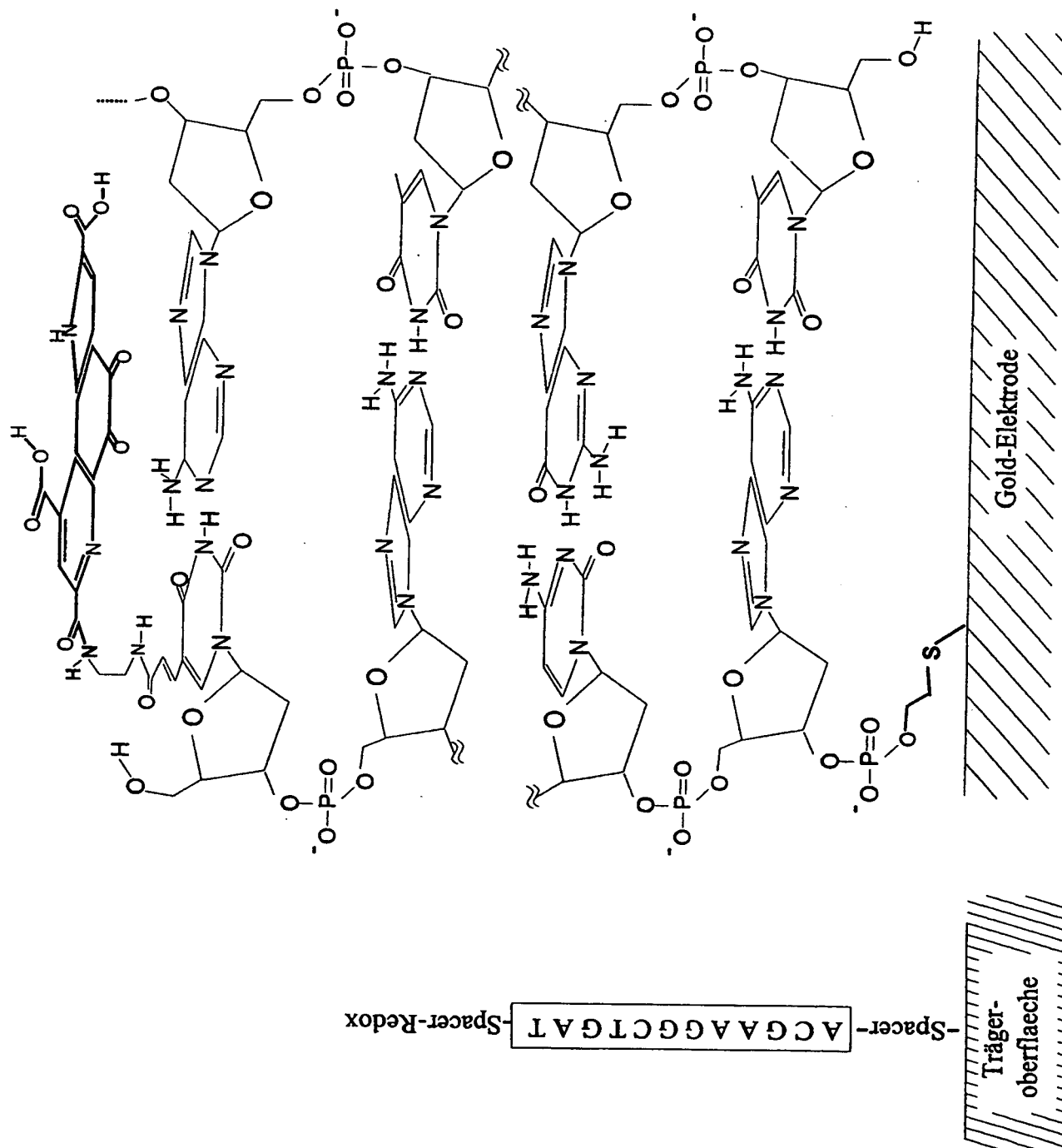


Fig. 3

Fig. 4

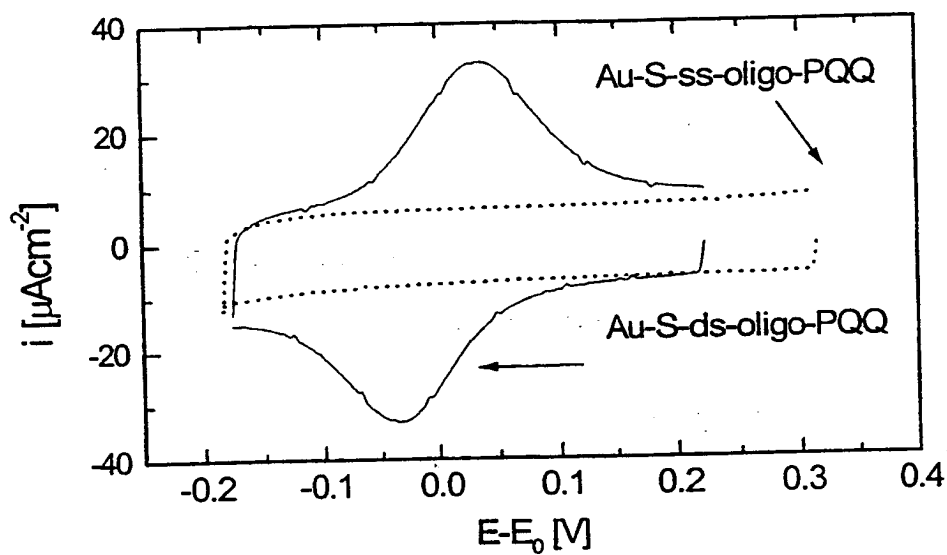
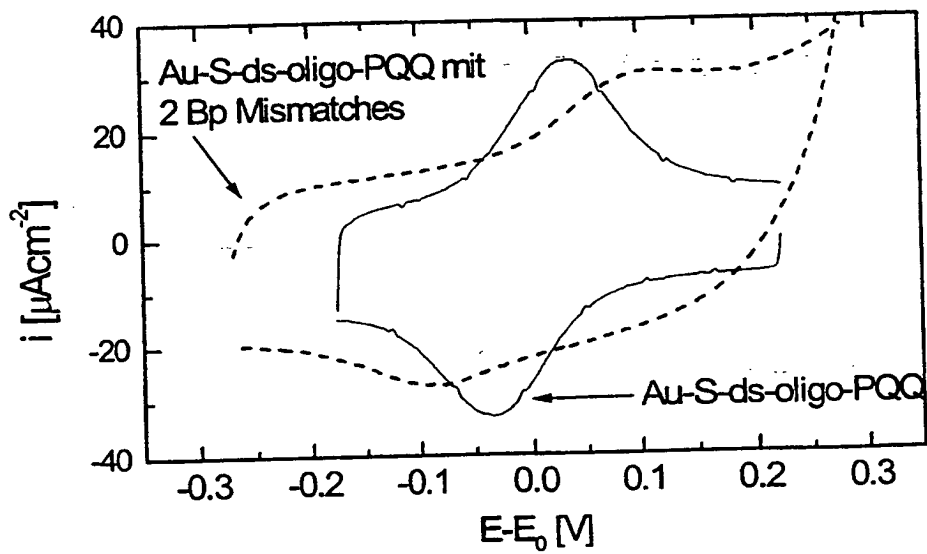


Fig. 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/EP 99/08888

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07H21/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.     |
|----------|--|---------------------------|
| A        | I.WILLNER ET AL.: "Assembly of<br>Functoinalized Monolayers of Redox<br>Proteins on Electrode Surfaces : Novel<br>Bioelectronic and Optobioelectronic<br>systems."<br>BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS,<br>vol. 12, no. 4, 1997, pages 337-356,<br>XP000874626<br>figures 7-10<br><br>-----<br>-/-- | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 February 2000

Date of mailing of the international search report

01/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. Application No

PCT/EP 99/08888

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.     |
|------------|--|---------------------------|
| A          | MILLAN K M ET AL: "VOLTAMMETRIC DNA BIOSENSOR FOR CYSTIC FIBROSIS BASED ON A MODIFIED CARBON PASTE ELECTRODE"<br>ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS,<br>vol. 66, no. 18,<br>15 September 1994 (1994-09-15), pages<br>2943-2948, XP000478033<br>ISSN: 0003-2700<br>abstract                                | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | JOHNSTON D H ET AL: "ELECTROCHEMICAL MEASUREMENT OF THE SOLVENT ACCESSIBILITY OF NUCLEOBASES USING ELECTRON TRANSFER BETWEEN DNA AND METAL COMPLEXES"<br>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC,<br>vol. 117, no. 35, 1995, pages<br>8933-8938-8938, XP002900562<br>ISSN: 0002-7863 | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | N.NAKAMURA ET AL.: "Electrochemical Properties of Coenzyme<br>Pyrroloquinolinequinone Using a<br>Di-(4-pyridyl) Disulfide Modified Gold<br>Electrode under Acidic Conditions."<br>BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN,<br>vol. 66, April 1993 (1993-04), pages<br>1289-1291, XP000867849<br>abstract                           | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | EP 0 831 327 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)<br>25 March 1998 (1998-03-25)<br><br>claims 1-29   | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | WO 96 40712 A (CALIFORNIA INST OF TECHN)<br>19 December 1996 (1996-12-19)<br><br>claims 1-27; example 8  | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | US 5 312 527 A (MIKKELSEN SUSAN R ET AL)<br>17 May 1994 (1994-05-17)<br><br>abstract   | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | WO 95 15971 A (CALIFORNIA INST OF TECHN)<br>15 June 1995 (1995-06-15)<br><br>the whole document  | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |

-/--



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/08888

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.         |
|------------|---|-------------------------------|
| A          | KATZ E ET AL: "ELECTROCHEMICAL STUDY OF<br>PYRROLOQUINOLINE QUINONE COVALENTLY<br>IMMOBILIZED AS A MONOLAYER ONTO A<br>CYSTAMINE-MODIFIED GOLD ELECTRODE"<br>JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY AND<br>INTERFACIAL ELECTROCHEMISTRY, NL, ELSEVIER,<br>AMSTERDAM,<br>vol. 367, 1 January 1994 (1994-01-01),<br>pages 59-70, XP000672483<br>ISSN: 0022-0728<br>the whole document | 1, 3, 9,<br>11, 21,<br>27, 28 |
| P, A       | WO 99 51778 A (BARTON JACQUELINE ; HILL<br>MICHAEL (US); KELLEY SHANA (US);<br>CALIFORNI) 14 October 1999 (1999-10-14)<br>examples 1-15   | 1, 3, 9,<br>11, 21,<br>27, 28 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/08888

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 2, 13  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

Field I.2 (continued)

Claims nos.: 2, 13

The valid patent claims relates to a disproportionately large number of possible compounds of which only a small portion can be supported by the description under the terms of Article 6 of the PCT or can be considered disclosed in the patent application under the terms of Article 5 of the PCT. In the case in question, the patent claims lack the corresponding support and the patent application lacks the corresponding disclosure to such a degree that a meaningful search with respect to the entire scope of protection sought seems impossible. As a result the search was directed towards those parts of the patent claims which appear supported and disclosed in the above sense, i.e. the parts relating to compounds containing pyrrolo-quinoline quinone as redox-active substance and compounds containing pyrrolo-quinoline quinone as the redox-active substance together with a gold electrode.

In addition, the valid patent claim no. 1 relates to products which are characterized by a desirable peculiarity or property, i.e. compounds defined by redox activity in a potential range of between -2.0V and 2.0V.

The patent claims therefore relate to all products presenting the above peculiarity or property, whereas the patent claim by the description under the terms of Article 6 of the PCT provides support for only a limited number of such products. In the case in question, the patent claims lack the corresponding support and the patent application lacks the corresponding disclosure to such a degree that a meaningful search with respect to the entire scope of protection sought seems impossible. Moreover, the patent claims also lack the clarity required under the terms of Article 6 of the PCT since an attempt is made in said patent claims to define the compounds in terms of their desired results (see above).

The applicant is reminded that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1 (e) PCT). As a general rule, the EPO in its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out an international preliminary examination will not conduct a preliminary examination for subjects in respect of which no search has been provided. This also applies to cases where the patent claims were amended after receipt of the international search report (Article 19 PCT) or to cases where the applicant provides new patent claims in keeping with the procedure mentioned in Chapter II of the PCT.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int Application No

PCT/EP 99/08888

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|---|---------------------|---|--|
| EP 0831327                                | A | 25-03-1998          | DE 19639169 A<br>CA 2216105 A<br>JP 10130247 A  | 02-04-1998<br>24-03-1998<br>19-05-1998   |
| WO 9640712                                | A | 19-12-1996          | US 5824473 A<br>AU 6166296 A<br>EP 0871642 A<br>US 5770369 A<br>US 5952172 A  | 20-10-1998<br>30-12-1996<br>21-10-1998<br>23-06-1998<br>14-09-1999   |
| US 5312527                                | A | 17-05-1994          | NONE  |  |
| WO 9515971                                | A | 15-06-1995          | US 5591578 A<br>AU 703329 B<br>AU 1215295 A<br>CA 2178618 A<br>EP 0733058 A<br>JP 9506510 T<br>US 5824473 A<br>US 5770369 A<br>US 5780234 A<br>US 5705348 A<br>US 5952172 A | 07-01-1997<br>25-03-1999<br>27-06-1995<br>15-06-1995<br>25-09-1996<br>30-06-1997<br>20-10-1998<br>23-06-1998<br>14-07-1998<br>06-01-1998<br>14-09-1999 |
| WO 9951778                                | A | 14-10-1999          | AU 3550699 A  | 25-10-1999   |

PCT/EP 99/08888

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07H21/00 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07H C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.        |
|------------|---|---------------------------|
| A          | I.WILLNER ET AL.: "Assembly of Functoinalized Monolayers of Redox Proteins on Electrode Surfaces : Novel Bioelectronic and Optobioelectronic systems."<br>BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS,<br>Bd. 12, Nr. 4, 1997, Seiten 337-356,<br>XP000874626<br>Abbildungen 7-10<br><br>---<br><br>-/- | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Februar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scott, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.        |
|------------|---|---------------------------|
| A          | MILLAN K M ET AL: "VOLTAMMETRIC DNA BIOSENSOR FOR CYSTIC FIBROSIS BASED ON A MODIFIED CARBON PASTE ELECTRODE" ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, Bd. 66, Nr. 18, 15. September 1994 (1994-09-15), Seiten 2943-2948, XP000478033<br>ISSN: 0003-2700<br>Zusammenfassung                           | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | JOHNSTON D H ET AL: "ELECTROCHEMICAL MEASUREMENT OF THE SOLVENT ACCESSIBILITY OF NUCLEOBASES USING ELECTRON TRANSFER BETWEEN DNA AND METAL COMPLEXES" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, Bd. 117, Nr. 35, 1995, Seiten 8933-8938-8938, XP002900562<br>ISSN: 0002-7863 | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | N. NAKAMURA ET AL.: "Electrochemical Properties of Coenzyme Pyrrroloquinolinequinone Using a Di-(4-pyridyl) Disulfide Modified Gold Electrode under Acidic Conditions." BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN, Bd. 66, April 1993 (1993-04), Seiten 1289-1291, XP000867849<br>Zusammenfassung                           | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | EP 0 831 327 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 25. März 1998 (1998-03-25)<br><br>Ansprüche 1-29  | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | WO 96 40712 A (CALIFORNIA INST OF TECHN) 19. Dezember 1996 (1996-12-19)<br><br>Ansprüche 1-27; Beispiel 8   | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | US 5 312 527 A (MIKKELSEN SUSAN R ET AL) 17. Mai 1994 (1994-05-17)<br><br>Zusammenfassung   | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| A          | WO 95 15971 A (CALIFORNIA INST OF TECHN) 15. Juni 1995 (1995-06-15)<br><br>das ganze Dokument   | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.        |
|------------|---|---------------------------|
| A          | KATZ E ET AL: "ELECTROCHEMICAL STUDY OF PYRROLOQUINOLINE QUINONE COVALENTLY IMMOBILIZED AS A MONOLAYER ONTO A CYSTAMINE-MODIFIED GOLD ELECTRODE" JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY AND INTERFACIAL ELECTROCHEMISTRY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Bd. 367, 1. Januar 1994 (1994-01-01), Seiten 59-70, XP000672483<br>ISSN: 0022-0728<br>das ganze Dokument | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |
| P,A        | WO 99 51778 A (BARTON JACQUELINE ;HILL MICHAEL (US); KELLEY SHANA (US); CALIFORNI) 14. Oktober 1999 (1999-10-14)<br>Beispiele 1-15  | 1,3,9,<br>11,21,<br>27,28 |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08888

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. 2,13   
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich   
 siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
  
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 2,13

Die geltenden Patentansprüche beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend Verbindungen mit Pyrrolo-Chinolino-Chinon als redoxaktive Substanz und Verbindungen mit Pyrrolo-Chinolino-Chinon als die redoxaktive Substanz zusammen mit einer Gold-Elektrode.

Desweiteren bezieht sich der geltende Patentanspruch 1 auf Produkte, die charakterisiert werden durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich Verbindungen definiert durch Redoxaktivität in einem Potentialbereich von -2.0V bis 2.0V.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte liefert. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verbindung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren (siehe oben).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In: AktENZEICHEN

PCT/EP 99/08888

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie   | Datum der<br>Veröffentlichung  |
|--|-------------------------------|---|--|
| EP 0831327 A                                       | 25-03-1998                    | DE 19639169 A<br>CA 2216105 A<br>JP 10130247 A  | 02-04-1998<br>24-03-1998<br>19-05-1998   |
| WO 9640712 A                                       | 19-12-1996                    | US 5824473 A<br>AU 6166296 A<br>EP 0871642 A<br>US 5770369 A<br>US 5952172 A  | 20-10-1998<br>30-12-1996<br>21-10-1998<br>23-06-1998<br>14-09-1999   |
| US 5312527 A                                       | 17-05-1994                    | KEINE   |  |
| WO 9515971 A                                       | 15-06-1995                    | US 5591578 A<br>AU 703329 B<br>AU 1215295 A<br>CA 2178618 A<br>EP 0733058 A<br>JP 9506510 T<br>US 5824473 A<br>US 5770369 A<br>US 5780234 A<br>US 5705348 A<br>US 5952172 A | 07-01-1997<br>25-03-1999<br>27-06-1995<br>15-06-1995<br>25-09-1996<br>30-06-1997<br>20-10-1998<br>23-06-1998<br>14-07-1998<br>06-01-1998<br>14-09-1999 |
| WO 9951778 A                                       | 14-10-1999                    | AU 3550699 A  | 25-10-1999   |